



**Applikation von Nanopartikeln als Implantatbeschichtung zur Präsentation
von biologisch aktivem BMP-2 an Implantatoberflächen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Nils Florian Poth

aus

Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. H. Menzel

2. Referent: apl. Prof. Dr. H.-J. Joerdening

eingereicht am: 26.11.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.03.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

N. Poth, V. Seiffart, G. Gross, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradable Chitosan Nanoparticle Coatings on Titanium for the Delivery of BMP-2, submitted.

Proceedings

N. Poth, J. Krautwurst, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradierbare Nanopartikel – beschichtbare Drug Release Systeme für medizinische Anwendungen. Tagungsband zum 9. Thüringer Biomaterial-Kolloquium 2013, S. 381-385.

W. Dempwolf, C. Lorenz, V. Seiffart, A. Hoffmann, A. Weizbauer, N. Poth, G. Gross, H. Windhagen, H. Menzel: Funktionelle Polymerbeschichtungen zur Modifikation von Implantatoberflächen. Tagungsband zum 7. Thüringer Biomaterial-Kolloquium 2011, S. 243 – 248.

Tagungsbeiträge - Vorträge

A. Bertz, N. Poth, W. Dempwolf, J.-E. Ehlers, H. Bunjes, S. Woehl-Bruhn, K.-H. Gericke, H. Menzel: Encapsulation of Proteins in Micro and Nano Hydrogel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. AMBA 2014, 18 - 21.11.2014, Gent, Belgien.

A. Bertz, N. Poth, W. Dempwolf, J.-E. Ehlers, H. Bunjes, S. Woehl-Bruhn, K.-H. Gericke, H. Menzel: Encapsulation of Proteins in Micro and Nano Hydrogel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. DGBM 2014, 06 - 08.11.2014, Dresden.

N. Poth, V. Seiffart, G. Gross, A. Weizbauer, H. Windhagen, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradable, Drug Loaded Nanoparticles for Implant Coatings. BMT 2014, 08 - 10.10.2014, Hannover.

W. Dempwolf, N. Poth, G. Gross, A. Weizbauer, H. Windhagen, H. Menzel: Biodegradable Nanocarriers for pharmaceutical active proteins. ISBPPB 2014, 09 - 12.07.2014, Washington D.C., USA.

A. Bertz, N. Poth, W. Dempwolf, J.-E. Ehlers, H. Bunjes, S. Woehl-Bruhn, K.-H. Gericke, H. Menzel: Encapsulation of Proteins in Micro and Nano Hydrogel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. 247th ACS Meeting 2014 – Symposium „Biorelated Polymers“, 16 - 20.03.2014, Dallas, USA.

N. Poth, J. Krautwurst, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradierbare Nanopartikel – beschichtbare Drug Release Systeme für medizinische Anwendungen. 9. Thüringer BIOMaterial Kolloquium, 03 - 05.09.2013, Zeulenroda.

W. Dempwolf, N. Poth, M. Waßmann, A. Winkel, G. Gross, H. Windhagen, M. Stiesch, H. Menzel: Ultrathin polymer films for adjustable implant surfaces. European Polymer Congress – EPF 2013, 16 - 21.06.2013, Pisa, Italy.

W. Dempwolf, N. Poth, A. Weizbauer, V. Seiffart, G. Gross, H. Menzel, H. Windhagen: Thin polymer layers – biomedical perspective and analytical challenge. Sustainable Bioresorbable and Permanent Implants of Metallic and Ceramic Materials – Colloquium 2011, 14 - 15.10.2011, Hannover.

Tagungsbeiträge – Poster

N. Poth, M. Waßmann, W. Dempwolf, H. Menzel: Polymer Coatings for Biomedical Applications. 5. Braunschweiger Jungchemiker Tagung, 15.04.2014, Braunschweig.

N. Poth, V. Seiffart, G. Gross, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradable, Drug Loaded Nanoparticles for Implant Coatings. ESB 2013, 08 - 12.09.2013, Madrid.

N. Poth, S. Seiffart, G. Gross, H. Windhagen, H. Menzel, W. Dempwolf: Biodegradable Nanoparticles as New Release Carrier for Medical Applications. (oral Poster) European Symposium on Biomaterials and Related Areas - Euro BioMAT 2013, 22 - 23.04.2013, Weimar.

N. Poth, V. Seiffart , G. Gross , H. Menzel, W. Dempwolf: Functionalization of Titanium Substrates with Biodegradable, BMP-2 Loaded Nanoparticles for Enhanced Osteointegration of Implants. DGBM 2012, 01 - 03.11.2012, Hamburg.

M. Sluszniak, N. Poth, M. Waßmann, C. Lorenz, C. Pfaffenroth, W. Dempwolf, H. Menzel: Maßgeschneiderte Polymerbeschichtungen für biomedizinische Anwendungen. Workshop: Neue Horizonte für metallische Biomaterialien, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, 02 - 03.05.2011, Geesthacht.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Henning Menzel möchte ich für die Ermöglichung meiner Promotion in dem spannenden und interdisziplinären Forschungsgebiet der Biomedizintechnik danken. Darüber hinaus danke ich ihm für die Betreuung meiner Dissertation, die interessante Aufgabenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Jomo Walla danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Herrn apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt der Projektleiterin des Teilprojekts D7 des SFB 599 Dr. Wibke Dempwolf für Ihre stete Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die Durchführung, Auswertung und Diskussion der XPS-Messungen. Auch den Kooperationspartnern im Projekt D7 (insbesondere: Andreas Weizbauer, Dr. Virginia Seiffart, Inge Hollatz-Rangosch, Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross) möchte ich für die unkomplizierte und gute Zusammenarbeit danken. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 599 bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Menzel danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre. Wenn ich ein Problem hatte, stand ich nie alleine im Regen und konnte mich immer auf die Hilfsbereitschaft der Gruppe verlassen. Dr. Corinna Lorenz möchte ich für die gute Einführung in die Thematik des Teilprojekts D7 und ihren Rat danken. Rolf Harrendorf aus der Werkstatt der Technischen Chemie danke ich für die Anfertigung spezieller Apparaturen, wie der Sprühhalterung für die Airbrush, die mir die Laborarbeiten erheblich erleichterten. Meinen Forschungspraktikanten Sebastian Stelljes, Judith Krautwurst, Maria Spät und Alex Groschopp danke ich für die praktische Unterstützung im Labor.

Peter Pfeiffer vom Institut für Werkstoffe der TU Braunschweig danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der REM-Messungen.

Zum Abschluss möchte ich noch meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Aufgabenstellung	5
3	Das Beschichtungssystem.....	6
3.1	Drug Delivery Systeme	6
3.1.1	Hydrogele.....	7
3.1.2	Nanopartikel	7
3.2	Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel	10
3.2.1	Chitosan	11
3.2.2	Tripolyphosphat	14
3.3	Osteoinduktive Wirkstoffe	15
3.3.1	Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)	16
3.3.2	BMP-2 Immobilisationstechniken auf Titan	17
3.4	Oberflächenmodifikation	19
3.4.1	Modifikation von Titan mit Chitosan und Tripolyphosphat	19
3.4.2	Modifikation von Titan mit Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln	20
3.4.3	Beschichtungsmethode – Sprühbeschichtung	21
4	Chitosan – Tripolyphosphat Nanopartikel: Ergebnisse	23
4.1	Chitosan (17) - Tripolyphosphat Nanopartikel.....	23
4.1.1	Partikelcharakterisierung: CS(17)-TPP	23
4.1.2	Beschichtungen	27
4.1.3	<i>In vitro</i> Studien: BSA und BMP-2.....	30
4.1.4	Überblick: Chitosan (17) - Tripolyphosphat Nanopartikel	33
4.2	Chitosan (42) - Tripolyphosphat Nanopartikel.....	34
4.2.1	Partikelcharakterisierung: CS(42)-TPP	39
4.2.2	Beschichtungen	44
4.2.3	<i>In vitro</i> Studien: BMP-2	52
4.2.4	<i>In vivo</i> Studie: Maus	59
4.2.5	<i>In vivo</i> Studie: Kaninchen	61
4.2.6	Überblick: Chitosan (42) - Tripolyphosphat Nanopartikel	64

4.2.7	Ausblick	65
5	Weiterentwicklung des CS(42)-TPP Systems.....	66
5.1	Phosphoryliertes Chitosan	66
5.1.1	Synthesen.....	66
5.1.2	Partikelcharakterisierung	72
5.1.3	Beschichtung.....	74
5.1.4	Übersicht: Phosphoryliertes Chitosan.....	80
5.1.5	Ausblick	81
5.2	Chitosan (42) – „DNA“ Nanopartikel'	82
5.2.1	Partikelcharakterisierung	82
5.2.2	Beschichtung.....	87
5.2.3	Überblick: Chitosan (42) – „DNA“ Nanopartikel	88
5.2.4	Ausblick	89
6	Zusammenfassung.....	90
7	Theoretische Grundlagen der Analytik.....	92
7.1	Dynamische Lichtstreuung^[117]	92
7.1.1	Aufbau: Zetasizer Nano ZS ^[117]	94
7.1.2	Partikelgröße via DLS ^[117]	95
7.1.3	Zetapotential via DLS ^[117]	97
7.2	Ellipsometrie^[131,132]	101
7.2.1	Aufbau und Messprinzip	101
7.2.2	Messgrößen	103
7.3	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie^[133]	103
7.3.1	Aufbau und Messprinzip ^[133]	104
8	Experimenteller Teil.....	107
8.1	Materialien	107
8.1.1	Titansubstrate	108
8.2	Polymercharakterisierung	108
8.2.1	NMR	108
8.2.2	Elementaranalyse.....	108

8.3 Nanopartikelcharakterisierung	108
8.3.1 Partikelgröße und Zetapotential	108
8.4 Beschichtungsmethode und -charakterisierung	109
8.4.1 Präparation der Titansubstrate	109
8.4.2 Oberflächenmodifikation	109
8.4.3 Ellipsometrie	109
8.4.4 REM	109
8.4.5 XPS	110
8.5 Kapitel 4.1 – CS(17)-TPP	110
8.5.1 Chitosan: Aufreinigung.....	110
8.5.2 CS(17)-TPP: Nanopartikel.....	110
8.5.3 CS(17)-TPP: pH-Titration	111
8.5.4 CS(17)-TPP: Beschichtungen	111
8.5.5 CS(17)-TPP: Beschichtungsstabilität.....	111
8.5.6 CS(17)-TPP: Degradation mit Lysozym	111
8.5.7 <i>In vitro</i> : CS(17)-TPP mit BSA	112
8.5.8 <i>In vitro</i> : CS(17)-TPP mit BMP-2	112
8.6 Kapitel 4.2 – CS(42)-TPP	113
8.6.1 Chitosan: Acetylierung	113
8.6.2 Viskosimetrie – Degradation von CS(17) und CS(42) mit Lysozym	113
8.6.3 CS(42)-TPP: Nanopartikel.....	114
8.6.4 CS(42)-TPP: Lagerungsstabilität	114
8.6.5 CS(42)-TPP: Degradation mit Lysozym	114
8.6.6 CS(42)-TPP: Stabilität bei 37 °C	115
8.6.7 CS(42)-TPP: Beschichtung	115
8.6.8 CS(42)-TPP: Beschichtung-XPS	115
8.6.9 CS(42)-TPP: Beschichtung-REM.....	115
8.6.10 CS(42)-TPP: Beschichtungsstabilität.....	115
8.6.11 CS(42)-TPP-BMP-2: Nanopartikel	116
8.6.12 <i>In vitro</i> : CS(42)-TPP mit BMP-2 (ELISA).....	116
8.6.13 <i>In vitro</i> : CS(42)-TPP mit BMP-2 (BRE-Luc)	117
8.6.14 <i>In vivo</i> : Maus	118
8.6.15 <i>In vivo</i> : Kaninchen	118
8.7 Kapitel 6.1 – phosphoryliertes Chitosan	119
8.7.1 Phosphorylierung nach PRAMANIK et al.....	119
8.7.2 Phosphorylierung nach NISHI et al.....	120

8.7.3	Phosphorylierung nach AMARAL et al. – CSP(42).....	121
8.7.4	Phosphorylierung nach CÁRDENAS et al. – CSDEP(42)	122
8.7.5	CSP(42)-TPP: Nanopartikel.....	123
8.7.6	CSDEP(42)-TPP: Nanopartikel	123
8.7.7	CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Degradation mit Lysozym.....	123
8.7.8	CSP(42) und CSDEP(42): Beschichtung.....	124
8.7.9	CSP(42) und CSDEP(42): Beschichtungsstabilität.....	124
8.7.10	CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Beschichtung	124
8.7.11	CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Beschichtungsstabilität.....	124
8.8	Kapitel 6.2 – CS(42)-„DNA“	124
8.8.1	CS(42)-ThP: Nanopartikel.....	124
8.8.2	CS(42)-dTTP: Nanopartikel.....	125
8.8.3	CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Degradation mit Lysozym	125
8.8.4	CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Beschichtung.....	125
8.8.5	CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Beschichtungsstabilität	125
9	Literaturverzeichnis	126

Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
ADP	Avalanche Photodiode
ALP	alkaline Phosphatase
BCA-Assay	Micro Bicinchoninsäure Protein Assay
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSA	Albumin aus Rinderserum
CD ₃ COOD	Essigsäure (d ₄ -deutert)
CS	Chitosan
CSP	Chitosan nach AMARAL et al. phosphoryliert
CSDEP	Chitosan nach CÁRDENAS et al. phosphoryliert
DA	Acetylierungsgrad
DCI	Deuteriumchlorid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
DS	Substitutionsgrad
dTTP	Natriumthymidintriphosphat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FBS	fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
IEP	isoelektrischer Punkt
m	Multiplett (NMR)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
μ-CT	Mikrocomputertomographie
NaOH	Natronlauge
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex (Werte von 0-1)
ppm	parts per million
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SFB 599	Sonderforschungsbereich 599
siRNA	small interfering RNA
t	Triplett (NMR)
ThP	5'-TTTTT-3' (DNA-Oligo. Thymidin-Pentamer)
TPP	Natriumtripolyphosphat
US	Ultraschallbad
XPS	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

Symbolverzeichnis

Viskosimetrie

t	Durchlaufzeit
ν	kinematische Viskosität
K	Instrumentenkonstante

Dynamische Lichtstreuung

q	Streulichtvektor
D	Diffusionskoeffizienten
τ	Messzeit
k	Boltzmannkonstante
η	Viskosität des Lösungsmittels
d(h)	hydrodynamischer Durchmesser
T	Temperatur
v	Wanderungsgeschwindigkeit
λ	Lichtwellenlänge
$\Delta\nu$	Frequenzverschiebung
n	Brechungsindex

θ	Detektionswinkel
E	elektrische Feldstärke
μ_e	elektrophoretische Mobilität
q	Ladung
r	Radius
ζ	Zetapotential
ϵ_0	absolute Dielektrizitätskonstante
ϵ_r	relative Dielektrizitätskonstante

Ellipsometrie

α, β, γ	Winkel für Reflexion und Transmission
d	Schichtdicke
h	plancksches Wirkungsquantum
ν	Frequenz
Δ	Phasenänderung (direkt erhaltene Messgröße)
ψ	$\tan \psi \equiv$ Veränderung im Amplitudenverhältnis (direkt erhaltene Messgröße)

Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

E_{kin}	kinetische Energie
E_B	spezifische Bindungsenergie eines Elektrons
ϕ_e	Energie der Neutralisierungselektronen

Kernspinresonanzspektroskopie

δ	Chemische Verschiebung
----------	------------------------

1 Einleitung

Nach Fallzahlen des Statistischen Bundesamts wurden in Deutschland im Jahr 2012 über 240.000 Hüftendoprothesen implantiert.^[1] Durch den demografischen Wandel der Bevölkerung steht die Endoprothetik vor dem Problem, dass immer mehr Menschen Implantate benötigen und als Folge der höheren Lebenserwartung auch häufiger Revisionsoperationen in Anspruch nehmen müssen. Trotz sehr guter Implantate und immer längerer Standzeiten im Patienten ist nach 10-14 Jahren bei ca. 30 % der Patienten eine chirurgische Revision des Implantats notwendig.^[2] Eine solche Revisionsoperation¹ stellt in der orthopädischen Medizin eine große Herausforderung dar, da das Erreichen einer guten Osseointegration von Revisionsimplantaten im Vergleich zur Erstimplantation stark erschwert ist und viel häufiger Komplikationen, wie Infektionen, auftreten.^[3] Revisionsoperationen sind in über 80 % der Fälle auf den Prozess der aseptischen² Endoprothesenlockerung zurückzuführen.^[2,4] Hauptursachen für diesen Lockerungsprozess sind, neben der natürlichen Alterung von Patienten und der damit einhergehenden Knochendegeneration, die Entstehung von Abriebpartikeln und ein Effekt, der als „stress shielding“ bezeichnet wird.^[2] In Abbildung 1.1 sind die beiden Vorgänge an einer Hüftendoprothese verdeutlicht.

Abriebpartikel

- Knochenresorption über proinflammatorische Zytokine

„stress shielding“

- Knochendegeneration über Belastungsabschirmung

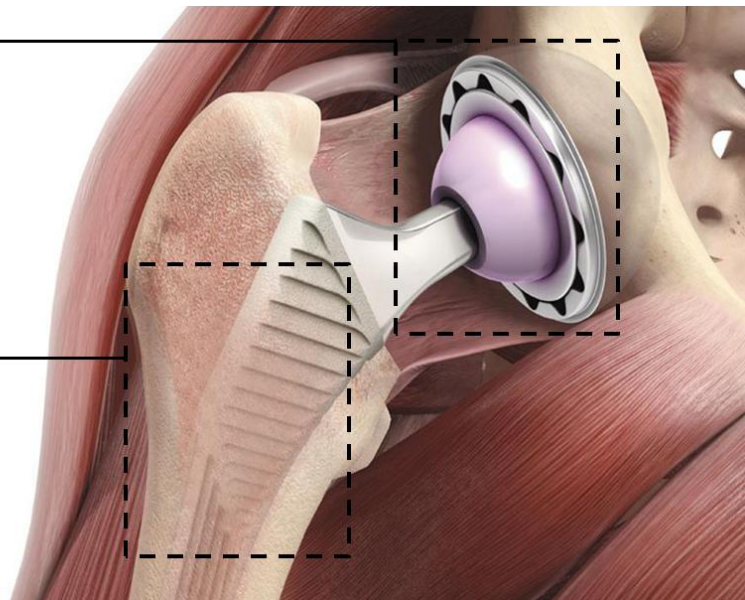


Abbildung 1.1: Darstellung aseptischer Lockerungsprozesse am Beispiel einer Hüftendoprothese.

¹ Revisionsoperation: Explantation eines Implantats und der Ersatz durch ein neues Implantat

² aseptisch: keimfrei, ohne Erreger

Abriebpartikel entstehen im Laufe des natürlichen Bewegungsprozesses in der Gleitpaarung des Implantats und können über verschiedene zelluläre Wege zur partikelinduzierten Knochenresorption führen. Durch die Expression proinflammatorischer Zytokine wird in diesem Fall die Aktivität von Osteoklasten³ gesteigert und die Aktivität der Osteoblasten⁴ gehemmt. Der Effekt des „stress shieldings“ hingegen beruht auf einem falschen Krafteintrag des Implantats in den Knochen. Somit kommt es an bestimmten Stellen im Knochen zu Über- beziehungsweise Unterbelastungen durch das Implantat, was wiederum einen Knochenumbau zur Folge hat. An Stellen, die zu stark beansprucht werden, verdickt sich der Knochen, um der Belastung standhalten zu können, wohingegen an Stellen mit einer geringen Belastung ein Knochenrückgang beobachtet werden kann. Knochenumbau und –abbau hat häufig eine Spaltbildung am Knochen/Implantat-Interface zur Folge und verschlechtert die Osseointegration des Implantats. Diese Knochenrückbildung ist die Grundlage zur Lockerung des Implantats, die starke Schmerzen im Bewegungsprozess des Patienten verursacht und eine Revisionsoperation notwendig macht. Allein in Deutschland mussten aufgrund einer aseptischen Endoprothesenlockerung im Jahr 2012 laut Statistischem Bundesamt ca. 37.000 Revisionsoperationen an Hüftendoprothesen durchgeführt werden.^[1]

Die bei einer Revisionsoperation notwendige Explantation des gelockerten Implantats hinterlässt einen beschädigten Knochen, da dieser bereits durch Osteolyse angegriffen ist und während der Explantation an Stellen mit gutem Knochen/Implantat-Kontakt Knochenfragmente mitsamt dem Implantat entfernt werden. Dementsprechend gestaltet sich die Revisionsoperation im Vergleich zur Erstimplantation als schwierig, da hier aufgrund des beschädigten Knochens ein viel schlechterer Implantat/Knochen-Kontakt vorliegt. An Stellen, an denen kein direkter Knochen/Implantat-Kontakt gegeben ist, kommt es zu dem von GRISTINA postulierten „race for the surface“.^[5] Dieser Prozess beschreibt das „Wettrennen“ zwischen Bakterien und Gewebezellen zur freien Oberfläche des Implantats. Für den Fall, dass Bakterien sich zuerst an der Implantatoberfläche ansiedeln und es zur Ausbildung eines Biofilms kommt, ist eine Entzündung und schlechte Integration des Implantats zu erwarten. Es gilt also, die Besiedlung der freien Implantatoberfläche mit Bakterien zu verhindern. Dies kann entweder über eine antimikrobielle Beschichtung oder über eine Beschichtung, die das Anwachsen von Gewebe an das Implantat unterstützt, erreicht werden.

³ Osteoklasten: für Knochenabbau verantwortliche Zellen

⁴ Osteoblasten: für Knochenaufbau verantwortliche Zellen

Im Rahmen des Teilprojekts D7 „Implantatoberflächen“ des Sonderforschungsbereichs 599 (SFB 599), in dem diese Dissertation angefertigt wurde, werden Beschichtungen entwickelt, die das Anwachsen von Gewebe (Knochen) an funktionalisierte Implantate unterstützen sollen. In den vorangegangenen Förderperioden des SFB 599 von 2003-2006 und 2007-2010 wurde über verschiedene Ansätze versucht, die Osseointegration von Revisionsendoprothesen über die Immobilisierung des Wachstumsfaktors „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) zu verbessern. BMP-2 ist ein Signalprotein, das in der Lage ist, Knochenbildung *in vivo* zu verstärken und zu induzieren^[6,7] und wurde eingesetzt, um die Proliferation, Differenzierung und Anlagerung von Osteoblasten während des „race for the surface“ zu unterstützen. Die Steigerung der Osteoblastenaktivität und ihre effektive Unterstützung könnten eine Möglichkeit darstellen, um eine Besiedlung des Implantats mit Osteoblasten zu erreichen und Knochenbildung in den Lücken zwischen Implantat und Knochen zu induzieren.^[8] Folglich wäre eine stark verbesserte Osseointegration des Implantats zu erwarten.

In der ersten Förderperiode von 2003-2006 wurde an „sich selbst organisierenden“ Monolayern zur Beschichtung von Titanoberflächen gearbeitet. Diese sollten in einem weiteren Schritt zur kovalenten Immobilisierung von BMP-2 verwendet werden. Resultate von ADDEN et al. zeigen, dass über die aus Phosphonaten bestehenden Monolayer BMP-2 auf Titanoberflächen präsentiert werden konnte.^[9] Die biologische Aktivität des BMP-2 wurde hier nicht evaluiert. Im Förderzeitraum von 2007-2010 wurden die Monolayer zu phosphonathaltigen Copolymeren weiterentwickelt und zur Funktionalisierung von Titanoberflächen eingesetzt. Die Copolymere enthielten funktionelle Gruppen über die BMP-2 kovalent an den Copolymerbeschichtungen angebunden werden konnte. Über verschiedene Methoden zur Quantifizierung von BMP-2 konnte in Untersuchungen von LORENZ et al. festgestellt werden, dass sich über die Copolymerbeschichtungen bis zu 110 ng/cm² BMP-2 auf Titanoberflächen immobilisieren lassen, jedoch nur ein kleiner Teil davon biologisch aktiv ist. Dies ist vermutlich auf die schlechte Zugänglichkeit des kovalent gebundenen BMP-2 zurückzuführen und resultierte darin, dass nur etwa 8 % (9 ng/cm²) des gebundenen BMP-2 biologisch aktiv waren.^[10] Darüber hinaus ist die über diesen Ansatz erzielte biologisch aktive BMP-2 Menge *in vivo* Studien zufolge nicht ausreichend, um eine effektive Steigerung der Osseointegration zu erzielen. Dies verdeutlicht, dass das immobilisierte Signalprotein BMP-2 über eine Freisetzung in Kontakt mit Zellen gebracht werden muss, um somit die Entfaltung

der biologischen Wirkung zu ermöglichen. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Dissertation die Freisetzung von unmodifiziertem BMP-2 aus einem der Anwendung angepassten Drug Delivery System auf Titanoberflächen anvisiert.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird in Anbetracht der zuvor geschilderten Problematik des mangelhaften Knochen/Implantat Kontakts im Bereich des Schafts eines Hüftimplantats nach einer Revisionsoperation und den Ergebnissen der vorangegangenen Förderperioden ein biokompatibles, polymerbasiertes Beschichtungssystem entwickelt. Hauptziele dieser Arbeit sind a) die erfolgreiche Immobilisierung des Wachstumsfaktors bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) auf Titanoberflächen zu realisieren und b) eine gezielte Freisetzung des unmodifizierten Wirkstoffs am Wirkort mit Hilfe eines Drug Delivery Systems zu ermöglichen. Darüber hinaus wird eine Steigerung der Menge an biologisch aktivem BMP-2 im Vergleich zu vorangegangenen Ansätzen angestrebt. Als Sekundärziele werden die Erarbeitung und Verwendung einer effektiven und einfach zu handhabenden Beschichtungsmethode und ein industriell leicht umsetzbarer Herstellungsprozess des Drug Delivery Systems verfolgt.

3 Das Beschichtungssystem

Als Beschichtungssystem wird ein literaturbekanntes Nanopartikelsystem aus Chitosan und Tripolyphosphat getestet.^[11] Die beiden Komponenten sind preiswert und lassen sich in einem simplen Prozess in Nanopartikel überführen. Weitere Gründe für die Wahl dieses Systems werden in diesem Kapitel ausführlich erläutert. Ziel ist es, aus Chitosan und Tripolyphosphat ein Nanopartikelsystem zur Freisetzung des osteoinduktiven Wirkstoffs bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) herzustellen. Dieses System soll die Möglichkeit bieten, BMP-2 über die Immobilisierung der Nanopartikel auf Implantatoberflächen in biologisch aktiver Form an der Oberfläche zu präsentieren. Im Folgenden wird dementsprechend eine Einführung in Drug Delivery Systeme gegeben, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Bestandteile näher betrachtet werden. Außerdem werden Beschichtungsmethoden für das gewählte System aus Chitosan und Tripolyphosphat auf Titan vorgestellt.

3.1 Drug Delivery Systeme

Heutzutage ist aus medizinischer Sicht die Verabreichung von Wirkstoffen, wie BMP-2, ohne ein adäquates Freisetzungssystem in vielen Fällen nahezu undenkbar. Aufgrund einer zu meist unzureichenden Stabilität und Löslichkeit vieler Wirkstoffe im humanen Organismus können Probleme, wie z.B. der frühzeitige Abbau des Wirkstoffs, entstehen.^[12] Dies kann in der Notwendigkeit resultieren, große Mengen des Wirkstoffs zu verabreichen, was eine systemische Toxizität oder eine aktive Wirkung des Stoffes an unerwünschten Stellen im Organismus zur Folge haben kann.^[12] Um diesen möglichen Nebeneffekten der Administration von Wirkstoffen entgegenzuwirken, werden Drug Delivery Systeme eingesetzt.^[13] Hierbei handelt es sich um Systeme, die sich mit dem gezielten Transport, Schutz und der Freisetzung von Wirkstoffen befassen. Ziel ist es, die Aktivität des Wirkstoffs im Organismus zu erhalten, Nebeneffekte durch den gezielten Transport und eine Dosisminimierung zu verhindern und eine, der Anwendung angepasste, Freisetzung des Wirkstoffs zu ermöglichen.

Die Erscheinungsform von Drug Delivery Systemen ist sehr unterschiedlich und variiert je nach Anwendung. Einige Beispiele sind Nanopartikel, Mizellen, Liposome, Mikrosphären und Hydrogele.^[14] Allen gemein ist, dass Strukturen vorliegen, in die Wirkstoffe eingelagert werden können. Da das in dieser Arbeit verwendete System aus Chitosan und Tripolyphosphat

ein Nanogel, also Nanopartikel, die aus einem quellbaren Netzwerk bestehen, bildet^[15,16], wird im Folgenden kurz auf Hydrogele und ausführlich auf Nanopartikel eingegangen.

3.1.1 Hydrogele

Hydrogele bestehen aus natürlichen, synthetischen oder hybriden Polymeren, die durch kovalente^[17,18] oder physikalische^[19,20] Vernetzungen ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden, siehe Abbildung 3.1. Die Bezeichnung Hydrogel ist auf die Eigenschaft, große Mengen wässriger Medien aufzunehmen, zurückzuführen. Die Wasseraufnahme basiert hierbei auf kapillaren, osmotischen und solvatisierenden Kräften und führt zu einem Aufquellen des Hydrogelnetzwerks. Dem Quellen des Netzwerks wirkt der „Streckwiderstand“ des Polymers entgegen. Somit wird an einem bestimmten Punkt ein Kräftegleichgewicht erreicht, das dem maximalen Quellungsgrad des Hydrogels entspricht.^[21,22]

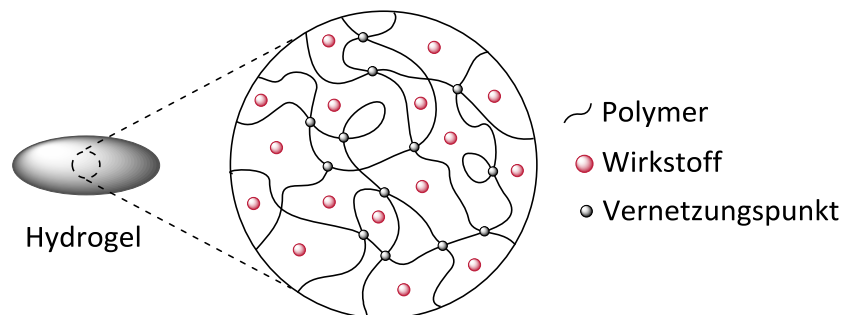


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Hydrogelausschnitts.

Aufgrund des hohen Wasseranteils sind Hydrogele humanem Gewebe sehr ähnlich und weisen eine sehr gute Biokompatibilität auf.^[21] Da die Einlagerung und somit der Schutz als auch der Transport von Wirkstoffen mit Hydrogelen möglich ist, werden Hydrogele besonders in Bezug auf Drug Delivery Systeme und „tissue engineering“ intensiv erforscht.^[23]

3.1.2 Nanopartikel

Als Nanopartikel können grundsätzlich alle kolloidalen Systeme, deren Partikeldurchmesser im Bereich von 1-100 Nanometer liegt⁵, bezeichnet werden.^[24] Im Bereich der Drug Delivery Systeme wird zwischen zwei verschiedenen Nanopartikelarten unterschieden: a) poröse, vernetzte Strukturen - Nanosphären und b) hohle Partikel - Nanokapseln. Mizellare Systeme und Liposomen sollen hier nicht näher betrachtet werden, gleichen aber stark schematisiert

⁵ Hierzu sei gesagt, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Partikelsysteme diese Anforderung meist nicht erfüllen und korrekterweise als Submikronpartikel bezeichnet werden müssten.

den Nanokapseln. In Abbildung 3.2 sind eine Nanosphäre und eine Nanokapsel jeweils mit eingelagertem Wirkstoff dargestellt. Während es sich bei Nanosphären um Matrix-Systeme handelt, in denen der Wirkstoff im gesamten Partikel statistisch verteilt vorliegt, können Nanokapseln als Vesikel-System verstanden werden. Nanokapseln bestehen aus einer außen liegenden Polymerschicht und einem Kern, in dem der Wirkstoff in einer Flüssigkeit vorliegt.^[14]

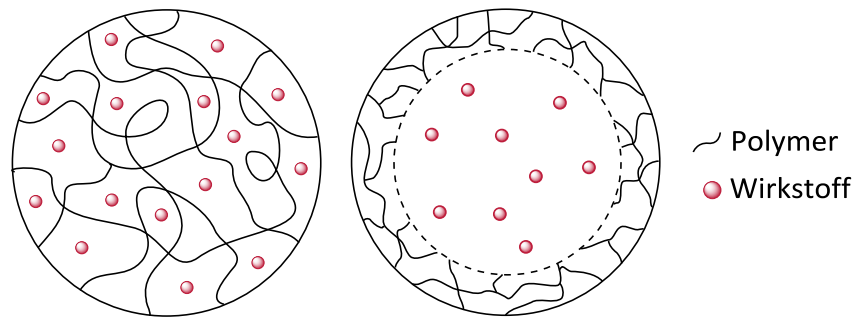


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung einer Nanosphäre (links) und einer Nanokapsel (rechts).

Nanopartikel, die Verwendung als Drug Delivery System finden, bestehen häufig zu einem Großteil aus synthetischen Polymeren oder Biopolymeren. Aufgrund der Fülle an Literatur auf diesem Gebiet und dem in dieser Arbeit verwendeten System aus Chitosan und Tripolyphosphat werden hier nur Beispiele mit Biopolymeren vorgestellt. Die wichtigsten Biopolymere, die zur Bildung von Nanopartikeln herangezogen werden, sind die Polysaccharide. Durch eine hohe Diversität an funktionellen Gruppen (Sulfat-, Hydroxyl-, Amino- und Carboxylgruppen) und somit vielen Modifikationsmöglichkeiten lässt sich eine große Vielfalt an verschiedenen Nanopartikelsystemen kreieren.^[25] Wichtige Eigenschaften, die durch gezielte Modifikation erzielt werden können, sind: a) eine Steigerung der Partikelstabilität zur Erhöhung der Zirkulationsdauer im Organismus, b) eine zielgerichtete Verteilung im Körper durch „zielsuchende“ Gruppen oder c) eine kontrollierbare Wirkstofffreisetzung durch stimuli-responsive Systeme, die pH- oder temperatur-sensitiv sein können.^[26] Die Partikelbildung kann im Allgemeinen über die folgenden Mechanismen^[25] ablaufen:

- kovalente Vernetzung^[27–29]
- ionische Vernetzung^[30–32]
- „self-assembly“ über hydrophobe Modifikation^[33–36]

Die Methode der ionischen Vernetzung wird aufgrund der milden Partikelbildungsbedingungen und einfachen Durchführbarkeit sehr häufig eingesetzt.^[25] Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass in den meisten Fällen keine Modifikation der Polysaccharide notwendig ist und somit das Vorhandensein von toxischen Substanzen, wie z.B. Glutaraldehyd^[29] bei der kovalente Vernetzung, ausgeschlossen werden kann. Die kovalente Vernetzung und die Partikelbildung über „self-assembly“ führen jedoch häufig zu stabileren Nanopartikeln, da diese nicht so stark auf Effekte, wie pH-Wert Änderungen, reagieren und/oder mechanisch stabiler sind.

Der Einsatz von Nanopartikeln bietet die interessante Möglichkeit Eigenschaften von Feststoffen, z.B. optische oder magnetische, mit der Fähigkeit von Molekülen, sich zu „bewegen“, zu vereinen.^[24,37] Über ihre geringe Größe und die daraus resultierende große Oberfläche bieten sich darüber hinaus viele Interaktionsmöglichkeiten mit biologischen Systemen.^[37] Ihre Größe ermöglicht es Nanopartikeln zudem in Zellen aufgenommen zu werden und somit Wirkstoffe in Zellen zu transportieren.^[24] Die Aufnahme in Zellen erfolgt über den Transport in Vesikeln oder direkt durch die Zellmembran in das Zytoplasma (Endozytose)^[37] und kann über die Wahl der Partikelkomponenten und die Variation der Oberflächenladung der Partikel beeinflusst werden^[24]. Mit Hilfe von Nanopartikeln können somit sogar Wirkstoffe in Zellen transportiert werden, die ohne ein Drug Delivery System nicht in der Lage sind die Zellmembran zu passieren oder unlöslich in Körperflüssigkeiten sind. Die Freisetzung von einem Wirkstoff kann jedoch auch extrazellulär erfolgen. Die möglichen Mechanismen für eine solche Freisetzung werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.2 Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel

Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel, siehe Abbildung 3.3, bilden sich über den zuvor angesprochenen Mechanismus der ionischen Vernetzung. Durch das Vermischen einer Lösung eines Polykations (Chitosan) und einer Lösung eines Polyanions (Tripolyphosphat) wird die „ionische Gelation“ initiiert.^[38]

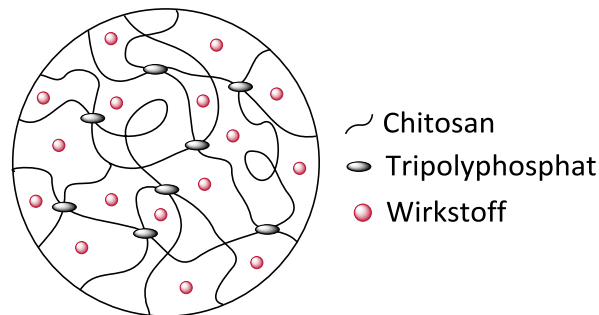


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikels.

Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Polyanionen und Polykationen, die zur Ausbildung ionisch vernetzter Nanopartikel führen. Triebkraft dieses Prozesses ist zum einen die elektrostatische Anziehung der Polyelektrolyte und zum anderen der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Gegenionen.^[39] Die Größe, die Verteilungsbreite und das Zetapotential⁶ der Partikel hängen ausschließlich von den jeweiligen Konzentrationen der Lösungen, dem Mischungsverhältnis, dem Molekulargewicht des Polymers und dem pH-Wert ab.^[40] Im Falle von Chitosan spielt darüber hinaus der Acetylierungsgrad (DA) eine Rolle, da bei niedrigen Acetylierungsgraden mehr freie Aminogruppen zur Wechselwirkung zur Verfügung stehen und sich die Anzahl positiver Ladungen am Chitosan erhöht (siehe Kapitel 3.2.1). Die Wirkstoffeinkapselung in Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel kann über zwei Verfahren erfolgen: a) der Wirkstoff wird vor der ionischen Vernetzung hinzugefügt, was in einer Einkapselung des Wirkstoffs im Partikel resultiert oder b) die gebildeten Partikel werden in einem Medium, das den Wirkstoff enthält, inkubiert und über Diffusion beladen.^[38,41] In den meisten Fällen wird die Einlagerung während der Partikelbildung verwendet, da sich über dieses Verfahren deutlich höhere Einlagerungseffizienzen erzielen lassen.^[41]

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus biodegradablen, polymeren Matrices, wie es bei Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln der Fall ist, wurde bereits in mehreren Arbeiten unter-

⁶ Das Zetapotential steht mit der Nettooberflächenladung eines Teilchens in Verbindung und wird in Kapitel 7.1.3 ausführlich beschrieben.

sucht. GAN et al.^[41] haben die Freisetzung von Rinderalbumin (BSA) aus Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln studiert und beschreiben drei grundlegenden Freisetzungsmechanismen, die nacheinander auftreten. Diese Mechanismen werden auch in einem Review von AGNIHOTRI et al.^[38] dargestellt.

- Desorption des Wirkstoffs von der Partikeloberfläche
- Diffusion und Desorption des Wirkstoffs aus dem Partikel
- Freisetzung des verbleibenden Wirkstoffs über die Degradation des Partikels

Aufgrund unterschiedlicher Werkstoffeigenschaften, wie z.B. Ladung, räumliche Struktur und Molekulargewicht/Größe, gelten diese Freisetzungsmechanismen jedoch nicht für jedes Transportsystem/Wirkstoff-Paar und müssen für jeden Wirkstoff in jedem System einzeln untersucht werden. Aus diesem Grund lassen sich nur bedingt Rückschlüsse auf die Einlagerung von BMP-2 in und die Freisetzung von BMP-2 aus Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln ziehen. Im Folgenden soll eine Übersicht über die Eigenschaften der Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Chitosan-Tripolyphosphat Systems gegeben werden.

3.2.1 Chitosan

Das Biopolymer Chitosan kann durch alkalische oder enzymatische Deacetylierung aus Chitin, einem in Krustentieren, Pilzen und Insekten vorkommenden Polysaccharid, gewonnen werden.^[42] Es handelt sich in den meisten Fällen um ein Copolymer aus 1,4-verknüpften 2-Acetylamino-2-desoxy- β -D-glucose (N-Acetylglucosamin) und 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucose (Glucosamin) Einheiten, siehe Abbildung 3.4. Ist der Anteil von Glucosamin im Polysaccharid höher als 50 % wird es als Chitosan bezeichnet, ist er niedriger heißt das Polysaccharid Chitin.^[43] Seltener kann auch 100 % deacetyliertes Chitin, also ein Homopolymer aus Glucosamin, erhalten werden.^[44]

Chitosan ist ein lineares Polysaccharid und verfügt über reaktive Hydroxyl- und Aminogruppen. Im Gegensatz zu Chitin, das nahezu in allen wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, lässt sich Chitosan aufgrund der protonierbaren Aminogruppen in sauren, wässrigen Medien lösen. Wird Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von ca. 50 % verwendet, kann es auch in reinem Wasser gelöst werden.^[44,45] Die freien Aminogruppen im Chitosan führen außerdem zu einer erhöhten Funktionalität im Vergleich zu Chitin. Dies spiegelt sich

in der größeren Anwendungsvielfalt (Hydrogele, Nanopartikel, Drug Delivery Systeme, Beschichtungen, Nahrungsmittelverpackungen, Abwasserbehandlung etc.)^[42] wider.

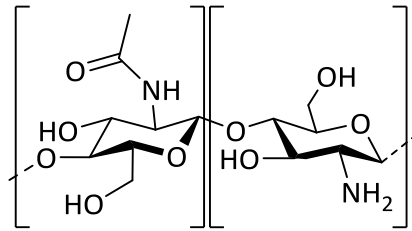


Abbildung 3.4: Chitosan - Copolymer aus N-Acetylglucosamin (links) und Glucosamin (rechts).

In Bezug auf Chitosan wird eine Vielzahl an biologischen Eigenschaften in der Literatur vorgestellt.^[46] Zu nennen sind hier insbesondere die für diese Arbeit relevanten Eigenschaften:

- **Biokompatibilität:** Der Hauptbestandteil des Chitosans, das Glucosamin, wird im menschlichen Körper aus Glucose hergestellt und dient als Grundlage zur Bildung von Glycosaminoglykanen, die ein wichtiger Baustein von Körpergewebe sind.^[47] Die Strukturähnlichkeit zu den in der extrazellulären Matrix vorkommenden Glycosaminoglykanen und Hyaluronsäure ist ein Grund für die gute Biokompatibilität von Chitosan.^[48,49] Darüber hinaus erfolgt im humanen Organismus der enzymatische Abbau des Polysaccharids zu natürlich vorkommenden Zuckerbausteinen, die vom menschlichen Körper verstoffwechselt oder ausgeschieden werden können.^[50] Des Weiteren wird Chitosan auf Basis vieler *in vitro* und *in vivo* Studien als nicht-toxisch angesehen.^[51] Von der Food and Drug Administration (FDA) wurde Chitosan bereits zum Einsatz in Wundverbänden zugelassen und kann in Japan, Italien und Finnland als Nahrungsmittelzusatz verwendet werden.^[51,52]
- **Biodegradabilität:** Ausführliche Übersichten über die *in vitro* und *in vivo* Degradation von Chitosan werden in den Reviews von DASH et al. und KEAN et al. gegeben.^[51,52] Hauptverantwortlich für die *in vivo* Degradation von Chitosan ist das Enzym Lysozym.^[43] Dies konnte von FREIER et al. in Degradationsversuchen mit Lysozym an Chitosanfilmen bestätigt werden.^[45] Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Degradationen zeigen auf, dass die Degradabilität von Chitosan stark vom verwendeten Acetylierungsgrad abhängt. Außerhalb eines Bereichs von 30-70 % Acetylierungsgrad findet nur eine sehr langsame, enzymatische Degradation statt, während zwischen 40-60 % Acetylierungsgrad die effektivste *in vitro* Degradation mit Lysozym beobachtet

werden konnte.^[45] Die Gegenwart von Lysozym in verschiedenen Körperflüssigkeiten, darunter auch in humanem Serum, konnte von BROUWER et al. und VENGE et al. nachgewiesen werden (ca. 1,5 µg/mL).^[53,54] Darüber hinaus ist Lysozym laut HANKIEWICZ et al. in fast allen humanen Körperflüssigkeiten enthalten und steht in humanem Serum sogar mit einer Konzentration von ca. 10 µg/mL zur Verfügung.^[55] Somit kann angenommen werden, dass Chitosan, mit einem entsprechenden Acetylierungsgrad, sich sehr gut zum Einsatz in einem biodegradablen Drug Delivery System eignet.

- **Osteoinduktivität:** In Untersuchungen von FAHKRY et al. zur Zellbesiedlung von Glassubstraten, die mit Chitosanfilmen beschichtet wurden, konnte unter Verwendung von Fibroblasten und Osteoblasten gezeigt werden, dass Chitosan einen positiven Effekt auf die Ansiedlung und Proliferation von Osteoblasten hat. Zusätzlich wird die Ansiedlung von Osteoblasten im Vergleich zu Fibroblasten deutlich präferiert.^[56] Resultate von LIN et al. zeigen zudem, dass Chitosanbeschichtungen auf Titansubstraten im Vergleich zu unbeschichteten Titanproben die Proliferation von Osteoblasten steigern, zu einer erhöhten Mineralisation führen und die Aktivität von alkaliner Phosphatase⁷ (ALP) stimulieren.^[58] Der osteoinduktive Effekt von Chitosan wird auch in einem Review von LEEDY et al. beschrieben.^[49] In einigen Publikationen konnte hier gezeigt werden, dass die bei der Degradation von Chitosan entstehenden Produkte die Expression von osteogenen Faktoren, wie BMP-2 und alkaliner Phosphatase, *in vitro* und *in vivo* stimulieren.^[49] Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit und für den Bereich der Osseointegrationssysteme eine sehr nützliche Eigenschaft des Chitosans, die die Besiedlung von Implantaten mit Knochenzellen und deren Proliferation unterstützen sollte.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Biokompatibilität, Biodegradabilität und der osteoinduktiven Eigenschaften von Chitosan wird es bereits in verschiedenen Osseointegrationssystemen in der Literatur verwendet und erforscht.^[49]

⁷ Alkaline Phosphatase ist ein Marker für die Differenzierung von Zellen zu Osteoblasten und nimmt eine Schlüsselrolle in der frühen Mineralisierung von Knochen ein.^[57]

3.2.2 Tripolyphosphat

Tripolyphosphat, hier Natriumtripolyphosphat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) siehe Abbildung 3.5, ist ein linear verknüpftes, kurzkettiges Oligomer. Es gehört zur Gruppe der Polyphosphate, die Polymerisationsgrade von $2\text{-}10^6$ umfassen^[59], und kann durch Kondensation aus Orthophosphaten, wie der Phosphorsäure, gewonnen werden^[60]. Polyphosphate kommen in allen Zellen natürlich vor und finden dort zum Beispiel Verwendung in der Herstellung von ATP (Adenosinriphosphat) aus ADP (Adenosindiphosphat).^[61] Natriumtripolyphosphat wurde von der FDA als sicher und biokompatibel klassifiziert und ist in den USA und Europa als Lebensmittelzusatz (E451) zugelassen.^[62] In Lebensmitteln werden Polyphosphate neben der Verbesserung von Wasserbindung und Emulgierbarkeit auch aufgrund antioxidativer und antibakterieller Eigenschaften eingesetzt.^[61]

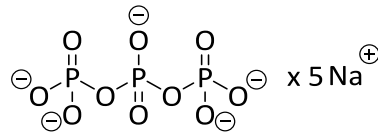


Abbildung 3.5: Strukturformel von Natriumtripolyphosphat.

In pharmazeutischen Drug Delivery Anwendungen wird Natriumtripolyphosphat sehr häufig in Kombination mit Chitosan verwendet, da sich so unter sehr milden Bedingungen Mikro- und Nanopartikel zum Wirkstofftransport herstellen lassen.^[62] Genau wie das zur Nanopartikelbildung verwendete Chitosan ist auch das Tripolyphosphat biodegradabel. Die Hauptabbaumechanismen für Polyphosphate sind die saure Hydrolyse und die enzymatische Degradation.^[63] Im humanen Organismus können Tripolyphosphate unter anderem von alkaliner Phosphatase, deren Expression durch BMP-2 und die Degradationsprodukte von Chitosan erhöht wird, zu Monophosphaten abgebaut werden.^[63] Die erhaltenen Monophosphate werden wiederum zur Mineralisation und Bildung von Knochen benötigt, der sich aus Kalziumphosphat (Hydroxylapatit) zusammensetzt. Somit sollte sich Natriumtripolyphosphat gut zum Einsatz in dem geplanten Osseointegrationssystem eignen.

Neben dem Grundgerüst der Nanopartikel aus Chitosan und Tripolyphosphat, spielt auch der eingelagerte, osteoinduktive Wirkstoff eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird deshalb eine kurze Einführung in osteoinduktive Wirkstoffe gegeben und das in dieser Arbeit verwendete bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) vorgestellt.

3.3 Osteoinduktive Wirkstoffe

Wirkstoffe, die unterstützend in den Prozess der Knochenbildung eingreifen, werden als osteoinduktiv bezeichnet. Die eigentliche Bedeutung von Osteoinduktivität wird sehr gut durch ein Zitat von ALBREKTSSON et al. wiedergegeben: „primitive, undifferentiated and pluripotent cells are somehow stimulated to develop into the bone-forming cell lineage“.^[64] Vereinfacht heißt das, dass Zellen zur Differenzierung in Knochenzellen angeregt werden und dadurch eine Ossifikation (Knochenbildung) induziert wird. In der Literatur sind bereits mehrere Wirkstoffe bekannt, die über verschiedene Mechanismen das Knochenwachstum *in vitro* oder *in vivo* stimulieren können. Im Folgenden sollen einige dieser Wirkstoffe kurz vorgestellt werden.

Neben dem prominentesten Vertreter der osteoinduktiven Wirkstoffe, dem bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), existieren auch noch weitere Substanzen mit ähnlicher Wirkung: z.B. BMP-4, BMP-7, Silibinin, Thymoquinon, Raloxifen und Alendronat. Für den Naturstoff Silibinin konnte in *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass die Behandlung von humanen Knochenmarkstammzellen mit Silibinin zu einer verstärkten Mineralisation und verstärkten Expression von Zelldifferenzierungsmarkern wie alkaliner Phosphatase (ALP), Osteocalcin, Runx2, Osterix und BMP-2 führt. Mittels dieser Effekte konnte die osteogene Differenzierung von Zellen über den BMP Signalweg gesteigert werden.^[65] Ein weiteres Beispiel liefert eine aktive Komponente des Schwarzkümmels, Thymoquinon. In Arbeiten von WIRRIES et al. wurde der Effekt von Thymoquinon auf Osteoblastenzellen (MC3T3-E1) untersucht und verdeutlicht, dass auch Thymoquinon die Expression von ALP, Osteocalcin, Osteopontin und BMP-2 verstärkt.^[66] Diese beiden Wirkstoffe sind jedoch nur in organischen Lösungsmitteln löslich. Dies birgt für die *in vitro* und *in vivo* Verwendung die Gefahr von unerwünschten Nebeneffekten, verursacht durch Lösungsmittelreste, und erschwert ihre Einlagerung in wasserbasierte Drug Delivery Systeme. Von HARMANKAYA et al. wird die Verwendung von wasserlöslichen, anti-osteoporotischen Wirkstoffen (Alendronat und Raloxifen) beschrieben, welche das Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und –resorption über die Regulation der Osteoklastenfunktion steuern. Im Tiermodell konnte hier eine Verbesserung des Einwachsens von funktionalisierten Schrauben im Vergleich zu unbehandelten Schrauben beobachtet werden.^[67] Unter Betrachtung der zuvor geschilderten Problematik des „race for the surface“ (siehe Seite 2) wird jedoch ersichtlich, dass eine Inhibierung der Osteoklasten (durch Raloxifen und Alendronat) zwar Knochenwachstum induzieren kann,

aber keinerlei Unterstützung bei der schnelleren Besiedlung der Implantatoberfläche durch Zellen liefert. Im Falle von Silibinin und Thymoquinon wäre der Literatur nach eine effektive Unterstützung der Zellbesiedlung in Kombination mit verstärktem Knochenwachstum zu erwarten. Das Löslichkeitsverhalten der beiden Wirkstoffe schränkt das Verwendungsspektrum in einem biokompatiblen, auf Wasser basierenden Drug Delivery System jedoch ein.

Das zu Beginn erwähnte BMP-2 wird in diesem Forschungsprojekt eingesetzt, da es die zuvor dargestellten Problematiken umgeht. BMP-2 ist ein wasserlösliches Protein und seine osteoinduktiven Eigenschaften wurden bereits in vielen Publikationen *in vitro* und *in vivo* belegt.^[6,68–70] Über die Steigerung der osteogenen Differenzierung und eine erhöhte Osteoblastenaktivität ist eine unterstützende Wirkung auf die Zellbesiedlung und die folgende Integration des Implantats zu erwarten.^[71,72] Darüber hinaus ist BMP-2 ein bereits zugelassener Wirkstoff, der sich aktuell im klinischen Einsatz befindet^[73,74] und von einem Projektpartner⁸ im SFB 599 zur Verfügung gestellt werden konnte. Die Familie der BMPs und das verwendete BMP-2 werden im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

3.3.1 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)

„Bone morphogenetic proteins“ (BMP) gehören als größte Unterfamilie zur Superfamilie der „transforming growth factors beta“ (TGF- β).^[75] Es handelt sich bei den BMPs um eine Gruppe osteoinduktiver Zytokine, die durch die Demineralisierung von Knochen mit Säure gewonnen werden können und von URIST entdeckt und benannt wurden.^[8,76] Ursprünglich erfolgte die Benennung dieser Proteingruppe aufgrund ihrer Fähigkeit ektopische⁹ Knochenbildung zu induzieren. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass die BMPs nicht nur in knochenbildende Prozesse eingreifen, sondern in viele andere Entwicklungsprozesse im menschlichen Körper involviert sind. Aus diesem Grund wurde in der Fachliteratur bereits vorgeschlagen den Namen von „bone morphogenetic proteins“ in „body morphogenetic proteins“ zu ändern.^[75,77] Laut des „First International BMP Workshops“ aus dem Jahre 2009 in Berlin konnten bereits ca. 30 verschiedene BMP-Typen isoliert werden.^[77] Anhand von Übereinstimmungen in Sequenz und Funktion können diese Proteine nochmals in Untergruppen aufgeteilt werden.^[75]

⁸ Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

⁹ Die Knochenbildung kann nicht nur am Knochen und in Knochengewebe, sondern auch in anderen Gewebeararten, d.h. ektopisch, induziert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete BMP-2 besteht aus 114 Aminosäuren. In aktiver Form liegt es als Dimer mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8,5 vor und ist über eine Disulfidbrücke verknüpft.^[8,78,79] Die BMP-2 Signalkaskade wird über das Anbinden des Proteins an die Zellrezeptoren BMP-Rezeptor Typ1 (BMPR-1) und BMP-Rezeptor Typ2 (BMPR-2), die sich an der Zelloberfläche befinden, gestartet. Hieraus resultiert die Expression von Faktoren wie Osterix, Runx2 und Dlx5, die wiederum wichtige Rollen in der Differenzierung zu potenten Osteoblastenzellen spielen. Auch knochenbildungsmarkierende Substanzen wie ALP werden exprimiert.^[72] Die genauen Abläufe und Funktionen der BMP-2 Signalkaskade sind ausführlich in der Literatur dargestellt.^[72,80]

Die Wirksamkeit von BMP-2 wurde, wie bereits anfangs gezeigt, in vielen Studien *in vitro* und *in vivo* bestätigt.^[6,68–70] Auch die Genehmigung des klinischen Einsatzes von BMP-2 durch die FDA spricht für eine unbedenkliche Verwendbarkeit. Jedoch gab es vor wenigen Jahren vermehrt Diskussionen um die risikofreie Einsetzbarkeit von BMP-2, insbesondere in größeren Mengen, wie es z.B. bei Wirbelsäulenoperationen notwendig ist. Das Journal „The Spine Journal“ publizierte 2011 einen kritischen Review, der sich mit möglichen Sicherheitsbedenken bei der Verwendung von BMP-2 in Wirbelsäulenoperationen beschäftigt.^[81] Daraufhin folgten viele Auseinandersetzungen und Diskussionen, die in der Gründung des unabhängigen Untersuchungsgremiums YODA (Yale University Open Data Access) endeten. Die Ergebnisse der Untersuchungen von YODA können in „Moving forward after YODA“^[82] eingesehen werden und zeigen auf, dass BMP-2 in hoher Konzentration möglicherweise cancerogen wirkt. Dementsprechend sollte es nur lokal und in sehr geringen Dosen eingesetzt werden.

Im vorliegenden Projekt steht die Freisetzung von BMP-2 von einer Titanoberfläche im Fokus. Verglichen mit Wirbelsäulenoperationen ist die lokale BMP-2 Konzentration in der geplanten Anwendung deutlich niedriger und sollte somit zu keinen Nebenwirkungen führen. Die Entwicklung in Bezug auf mögliche, ungewollte Nebeneffekte von BMP-2 muss allerdings im Auge behalten werden, falls neue Daten belegen sollten, dass selbst geringe BMP-2 Mengen negative Auswirkungen aufweisen.

3.3.2 BMP-2 Immobilisationstechniken auf Titan

Die Freisetzung von BMP-2 soll nach einer Immobilisierung des Proteins von einer beschichteten Titanoberfläche erfolgen. Für die Wahl einer geeigneten Immobilisationstechnik muss beachtet werden, dass a) BMP-2 über eine gute Löslichkeit in Körperflüssigkeiten verfügt und dementsprechend schnell vom vorgesehenen Wirkort abtransportiert werden^[83] und b)

BMP-2 im humanen Organismus eine sehr geringe Halbwertszeit von ca. 10-15 Minuten aufweist und demzufolge schnell degradiert wird^[76]. Ein Überblick über bereits veröffentlichte Immobilisationstechniken von BMP-2 auf Titan soll im Folgenden gegeben und im Anschluss hinsichtlich der Applikabilität bezüglich der zuvor beschriebenen Problematik diskutiert werden:

- Adsorption an Titan^[68,84,85]
- Adsorption an Hydroxylapatit-Schichten^[86]
- kovalente Immobilisierung über Polymere^[87]
- kovalente Immobilisierung über Copolymere^[10]
- kovalente Immobilisierung über Biopolymere^[88–90]
- Anbindung an selbst-organisierte Monoschichten^[9]
- Einbau in Polyelektrolyt-Multilayer^[70,91,92]
- Einlagerung als Nanokomplex in Hydroxylapatit-Schichten^[93]

Die reine BMP-2 Adsorption an Titan oder Hydroxylapatit^[68,84–86] ohne Verwendung eines Drug Delivery Systems wird für diese Arbeit nicht weiter in Betracht gezogen, da BMP-2 im Körper sehr schnell abtransportiert und abgebaut wird. Darüber hinaus beschreiben CHEN et al. in einem Review, dass die physikalische Adsorption des reinen Proteins Konformationsänderungen oder eine Denaturierung des Proteins zur Folge haben kann.^[94]

Die kovalente Immobilisierung von BMP-2 über verschiedene Linker^[9,10,87–90] hingegen ist ein vielversprechender Ansatz, der das BMP-2 am Wirkort fixiert und somit vor dem Abtransport schützt. Bei dieser Methode handelt es sich jedoch um eine komplizierte Technik, für die die Titanoberfläche meist in mehreren Schritten vorfunktionalisiert werden muss.^[94] Des Weiteren konnte von LORENZ et al. gezeigt werden, dass die kovalente Anbindung von BMP-2 zu einem Aktivitätsverlust des Proteins führen kann, da die Rezeptoren an der Zelloberfläche durch die Fixierung des Proteins nicht mehr erreicht werden können.^[10]

Die Einlagerung von BMP-2 in ein Drug Delivery System auf der Titanoberfläche scheint eine gute Möglichkeit darzustellen, um unmodifiziertes BMP-2 über einen definierten Zeitraum freizusetzen und vor einem frühzeitigen Abbau zu schützen.^[70,91–93] Das Protein kann somit über eine Degradation des Drug Delivery System oder durch Diffusion aus diesem kontrolliert am Wirkort freigesetzt werden. Die Methode der Freisetzung von unmodifiziertem

BMP-2 aus einem Drug Delivery System von der Titanoberfläche wird auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

3.4 Oberflächenmodifikation

Die Beschichtung von Titanoberflächen mit BMP-2 beladenen Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln ist nach der Partikelbildung die nächste Herausforderung. Im Folgenden werden deshalb Möglichkeiten aufgezeigt, wie Chitosan und Tripolyphosphat auf Titan immobilisiert werden können und welche dieser Ansätze sich auf die Nanopartikel übertragen lassen.

3.4.1 *Modifikation von Titan mit Chitosan und Tripolyphosphat*

Die unterschiedlichen Varianten der Modifikation von Titanoberflächen mit Chitosan können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: a) kovalente Anbindung und b) Immobilisierung über Adsorption.

- **Kovalente Anbindung:** Die kovalente Immobilisierung von Chitosan erfolgt häufig über einen Linker (Silane, Dopamin etc.), der das Polysaccharid mit der Titanoberfläche, z.B. via Amidkupplung, verknüpft.^[88,95] Möglich sollte auch eine Immobilisierung phosphorylierter Chitosane sein, da nach ADDEN et al. vieles dafür spricht, dass Alkylphosphonsäuren kovalent an Titan anbinden können.^[9] In diesem Fall würde die Bindung direkt zwischen dem Polysaccharid Chitosan und der Titanoberfläche erfolgen und kein Linker benötigt werden.
- **Immobilisierung über Adsorption:** Die Immobilisierung von Chitosan kann auch über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Polysaccharid und Titanoberfläche realisiert werden. Als Polykation kann Chitosan an die partiell negativ geladene Titanoberfläche angelagert werden.^[91,92,96] Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung bietet die elektrochemische Abscheidung (Elektrodeposition) von Chitosan an der Titanoberfläche.^[97,98]

Über die Immobilisierung von Tripolyphosphat auf Titan sind in der Literatur keine Untersuchungen vorhanden. Jedoch weisen Studien von VIORNERY et al. darauf hin, dass Alkylphosphonsäuren kovalent an Titanoberflächen anbinden können.^[99] In Veröffentlichungen von LORENZ et al. und ADDEN et al. konnte diese Beobachtung auch für die Immobilisie-

rung von phosphonathaltigen, selbstorganisierten Monolayern und Copolymeren bestätigt werden.^[9,10] Auf diesen Ergebnissen basiert die Vermutung, dass auch Phosphatgruppen an Titan anbinden können und sich Chitosan-Tripolyphosphat Partikel somit über freie Phosphatgruppen des Tripolyphosphates auf Titan immobilisieren lassen müssten.

Ob die Immobilisierung über Adsorption oder über eine Anbindung durchgeführt wird, spielt in Anbetracht des Implantationsprozesses eine untergeordnete Rolle, da Hüftimplantate während einer Operation in den Oberschenkelknochen „eingeschlagen“ werden. Somit wirken extreme Abriebkräfte von der umgebenden Spongia des Knochens auf die Oberfläche des Implantats. Diesen abrasiven Kräften wären die Beschichtungen beider Immobilisationstechniken nicht gewachsen. Hier besteht jedoch die Möglichkeit den auf die Beschichtung wirkenden Implantationsstress über eine definierte Oberflächengeometrie des Implantats stark zu reduzieren. Aus diesem Grund ist für die angestrebte Beschichtung nur die Stabilität unter physiologischen Bedingungen entscheidend.

3.4.2 Modifikation von Titan mit Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln

Zu der Modifikation von Titan mit Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln konnten keine Untersuchungen in der Literatur gefunden werden. Auch ein Vergleich mit den zuvor beschriebenen Methoden zur Immobilisierung der Einzelkomponenten fällt schwer, da die Nanopartikel ein komplexes, flexibles System darstellen. Im Falle der Nanopartikelbeschichtung muss darauf geachtet werden, dass der pH-Wert und die Temperatur nach Möglichkeit wenig Änderung erfahren, um das Partikelsystem und das eingelagerte Protein intakt zu halten. Des Weiteren könnten Substanzen, die zur Anbindung verwendet werden, siehe Anbindung von Chitosan, über Diffusion in die Partikel eingelagert werden und später *in vivo* zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Darüber hinaus sind neben der Anbindungsreaktion auch Reaktionen mit dem Protein denkbar, die möglicherweise zu einer Desaktivierung des Proteins führen könnten. Die dargestellten Probleme, die bei der Immobilisierung von Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln auftreten können, zeigen deutlich, dass nur sehr milde Methoden, nach Möglichkeit ohne Fremdsubstanzen, zur Beschichtung von Titan mit den Nanopartikeln geeignet sind. Denkbar wäre die bereits erwähnte kovalente Anbindung über freie Phosphatgruppen des Tripolyphosphates oder die Adsorption an die Titanoberfläche über Wechselwirkungen zwischen der partiell negativ geladenen Titanoberfläche und den, je nach Zusammensetzung, positiv geladenen Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln, siehe Abbildung 3.6.

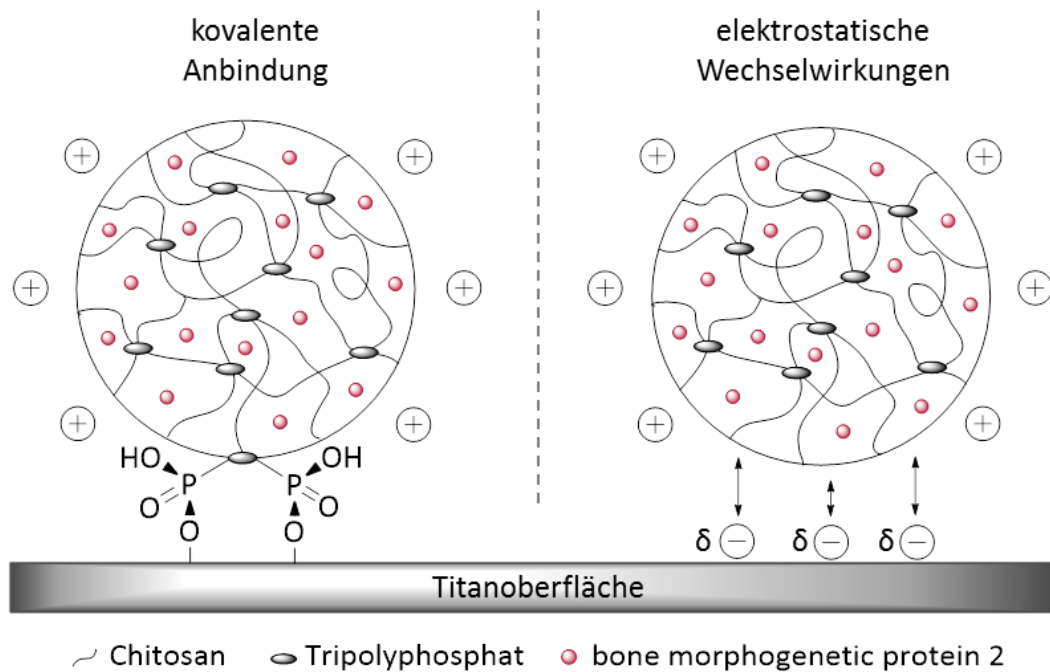


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Immobilisierungsmöglichkeiten von BMP-2 beladenen Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln auf Titanoberflächen.

3.4.3 Beschichtungsmethode – Sprühbeschichtung

Neben der Immobilisierung der Nanopartikel spielt auch die Beschichtungsmethode eine wichtige Rolle. Wie in der Aufgabenstellung beschrieben, wird nach einem industriell leicht umsetzbaren Prozess gesucht. Die Sprühbeschichtung erscheint im Vergleich zu anderen Methoden wie der Tauchbeschichtung oder der Lagerung in Lösung am besten geeignet zu sein, da hier nicht nur direkt mit der Partikelbildungssuspension gearbeitet werden kann, sondern auch beliebig dicke Schichten in kurzer Zeit reproduzierbar hergestellt werden können.^[100] Außerdem ist das benötigte Partikelsuspensionsvolumen viel geringer als bei Prozessen wie der Tauchbeschichtung und der Lagerung in Lösung.

Die Sprühbeschichtung basiert auf der Erzeugung eines Aerosols aus einem Gas und der verwendeten Flüssigkeit. Hierbei wird das Gas mit Druck an einem Zulauf der Flüssigkeit vorbeigeleitet und „zerstäubt“ diese. Es bildet sich ein Gas/Flüssigkeits-Gemisch mit sehr fein verteilten Tröpfchen aus, ein Aerosol. Je höher der Gasdruck eingestellt wird, desto feiner ist die Dispersion der Tröpfchen in der Gasphase. Ein feineres Aerosol hat beim Einsatz für Beschichtungen auch eine homogenere Schichtauftragung auf Oberflächen zur Folge. In Abbildung 3.7 ist eine Sprühpistole (Airbrush) dargestellt, mit deren Hilfe Sprühbeschichtungen durchgeführt werden können. Die abgebildete Airbrush Aztek A470 wurde für die in dieser

Arbeit durchgeführten Beschichtungsversuche verwendet und setzt sich aus den folgenden Hauptkomponenten zusammen: (1) variierbare Sprühdüse, (2) Flüssigkeitsvorrat (3) Hebel zum Regeln des Gas- und Flüssigkeitsstroms (double action Airbrush), (4) Flüssigkeitsmengenregler und (5) Druckluftanschluss.



Abbildung 3.7: Aztek A470 Airbrush.

In der Praxis wird das aus der Sprühdüse austretende Aerosol auf die zu beschichtende Oberfläche aufgetragen, siehe Abbildung 3.8. Durch diesen Vorgang werden die fein verteilten Suspensionströpfchen, die wiederum Feststoff, in diesem Fall Nanopartikel, enthalten, auf die Oberfläche aufgebracht. Die kontinuierliche Evaporation der Flüssigkeit ist durch den zur Auftragung des Aerosols verwendeten Gasstrom gewährleistet. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass der Flüssigkeitsstrom nicht zu groß eingestellt wird, da es ansonsten an der Substratoberfläche zu einer Koaleszenz der Flüssigkeitstropfen und somit zur Ausbildung eines Flüssigkeitsfilms kommen kann. Dies wird durch einen zu hohen Flüssigkeitsanteil im Aerosol und einer zu geringe Zeitspanne, die zur Evaporation der Flüssigkeit zur Verfügung steht, verursacht.

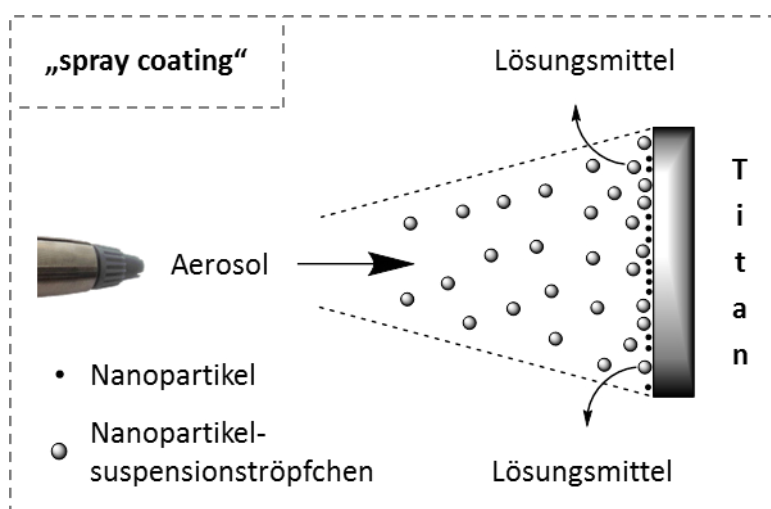


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Sprühbeschichtung eines Titansubstrates mit einer Nanopartikelsuspension.

4 Chitosan – Tripolyphosphat Nanopartikel: Ergebnisse

Der Einsatz von Chitosan (CS) in medizinischen Anwendungen, in dieser Arbeit als Beschichtung für den Schaft von Hüftimplantaten, erfordert eine sehr hohe Reinheit des Polysaccharids, um die Präsenz von Fremdstoffen und Proteinkontaminationen ausschließen zu können.^[40] Aus diesem Grund ist eine Aufreinigung erforderlich, bevor Chitosan zur Herstellung von Nanopartikeln und dementsprechend auch für *in vivo* und *in vitro* Studien verwendet wird. In Publikationen zu Chitosan sind verschiedene Aufreinigungsmethoden beschrieben.^[40,41,101] Die Aufreinigung¹⁰ wurde in dieser Arbeit nach GAN et al. durchgeführt und liefert über die Abtrennung der Verunreinigungen ein Chitosan, das sich rückstandslos in eine klare, geruchslose Lösung überführen lässt.^[41] Vor der Aufreinigung führte das Herstellen einer Chitosanlösung zu einer leicht gelblichen Lösung, in der teilweise Schwebstoffe enthalten waren und die einen charakteristischen Geruch aufwies. Deshalb wurde für alle nachfolgend vorgestellten Partikelsysteme ausschließlich das aufgereinigte Chitosan verwendet. Der Acetylierungsgrad (DA) des aufgereinigten Chitosans wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt und liegt bei ca. 17 %, siehe Kapitel 8.5.1.

4.1 Chitosan (17) - Tripolyphosphat Nanopartikel

Das erste untersuchte Partikelsystem, das zur Einlagerung von BMP-2 genutzt wurde, besteht aus aufgereinigtem Chitosan (DA 17 %) und Tripolyphosphat (TPP). Die Charakterisierung der hergestellten Partikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung vorgenommen. Darüber hinaus werden Beschichtungsversuche und *in vitro* Studien vorgestellt.

4.1.1 Partikelcharakterisierung: CS(17)-TPP

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, können das Polykation Chitosan und das Polyanion Tripolyphosphat über ionische Wechselwirkungen Nanopartikel bilden. In dieser Arbeit wurde die Nanopartikelbildung über die Zugabe einer Tripolyphosphatlösung zu einer Chitosanlösung induziert. Zur Homogenisierung wurde die Nanopartikelsuspension manuell mit einer Eppendorfpipette durchmischt. In anderen Veröffentlichungen zu CS-TPP Nanopartikel werden leicht abweichende Methoden beschrieben. Von KONECNI et al., SCHÜTZ et al. und WANG et al. werden die bereits gemischten Lösungen bis zu einer Stunde gerührt, um eine homo-

¹⁰ Kochen in Natronlauge – Waschen – Filtrieren – Lösen in Essigsäure – Filtrieren – Dialyse – Gefriertrocknung.

gene Durchmischung zu erzeugen.^[101–103] Dieser Schritt scheint überflüssig, da die ionische Gelierung ein spontan ablaufender Prozess ist und in hier durchgeführten Messungen kein relevanter Unterschied zwischen dem kurzen Durchmischen über eine Pipette und längerem Rühren festgestellt werden konnte. Auch von MORRIS et al. wird die Partikelcharakterisierung direkt nach kurzem Durchmischen der Lösungen vollzogen.^[104] Du et al. führen die Durchmischung und Homogenisierung mittels Ultraschallbehandlung durch.^[105] Diese Methode wird angesichts des von TANG et al. beschriebenen Sachverhalts, dass eine Ultraschallbehandlung von Chitosan mit dem Abbau des Polysaccharids einhergeht, hier nicht angewendet.^[106]

Durch Variation des Mischungsverhältnisses und des pH-Wertes ist es möglich Partikeleigenschaften wie Größe, Verteilungsbreite und Zetapotential zu steuern.^[40] In dieser Arbeit wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Chitosan zu Tripolyphosphat getestet. Dabei stellten sich die 2:1- und 3:1-Verhältnisse von Chitosan:Tripolyphosphat mit je 1 mg/mL aufgrund ihrer geringen Verteilungsbreite (PDI) als am besten geeignet heraus. Ein niedriger PDI steht für eine monodispersere Probe und erleichtert somit das Analysieren von Effekten durch pH-Wert Änderung, Proteineinlagerung und Degradation. Eine typische Partikelgrößenverteilung von CS(17)-TPP im Verhältnis 3:1 wurde mittels dynamischer Lichtstreuung, siehe Kapitel 7.1.2, für zwei verschiedene Essigsäurekonzentrationen bestimmt und ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

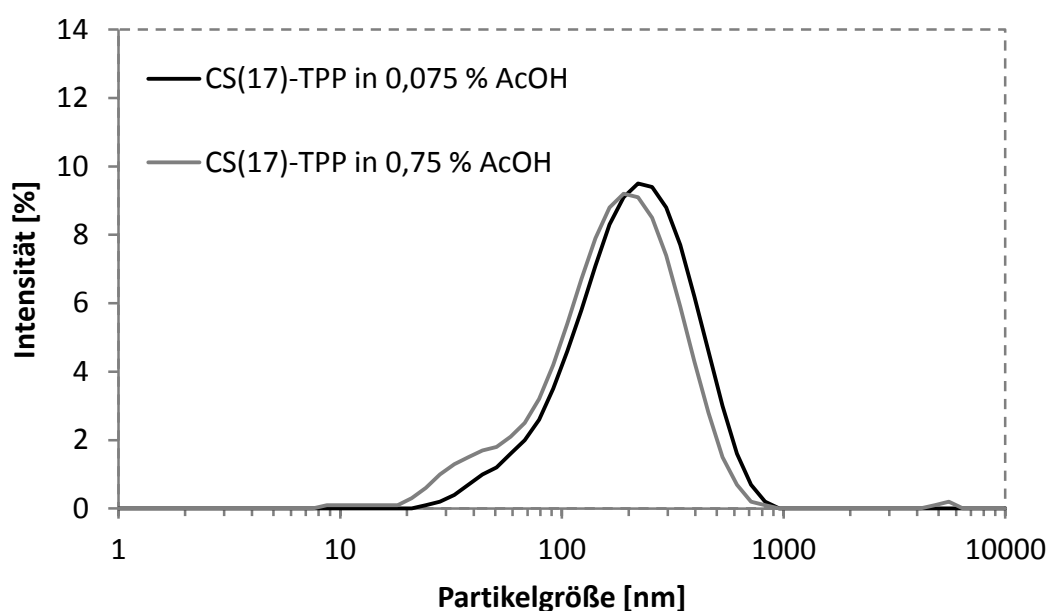


Abbildung 4.1: Partikelgrößenverteilung von zwei Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikelsuspensionen mit unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen.

Die Partikelgrößenverteilung zeigt für beide Proben eine Schulter vor dem Hauptpeak, die auf die Anwesenheit von kleinen Partikeln hindeutet. Wie in Kapitel 7.1 näher erläutert wird, überdecken die größeren Partikel des Hauptpeaks aufgrund einer viel höheren Streuintensität die kleinen Partikel fast vollständig. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Schulter für die höhere Essigsäurekonzentration größer ausfällt und zusammen mit dem Staubpeak im Mikrometerbereich zu einem höheren PDI führt. Für die Probe in 0,075 %-iger Essigsäure ergibt sich ein z-Average (gemittelter Partikeldurchmesser) von $\text{ca. } 170 \pm 92 \text{ nm}$ mit einem PDI von 0,29. Wohingegen die Probe in 0,75 %-iger Essigsäure einen kleineren z-Average von $\text{ca. } 130 \pm 80 \text{ nm}$ mit einem PDI von 0,38 besitzt. Neben der Einheitlichkeit und der Partikelgröße wird besonders das Zetapotential der Partikel durch die Essigsäurekonzentration, also den pH-Wert, beeinflusst. In Abbildung 4.2 sind die Zetapotentialmessungen der beiden Proben gezeigt. Dabei ist ersichtlich, dass die Probe mit der höheren Essigsäurekonzentration ein deutlich höheres Zetapotential besitzt, +46 mV im Vergleich zu +36 mV. Die Erhöhung des Zetapotentials ist auf den pH-abhängigen Protonierungsgrad der Aminogruppen des Chitosans zurückzuführen und resultiert über das Absenken des pH-Wertes in einer höheren, positiven Ladungsdichte.

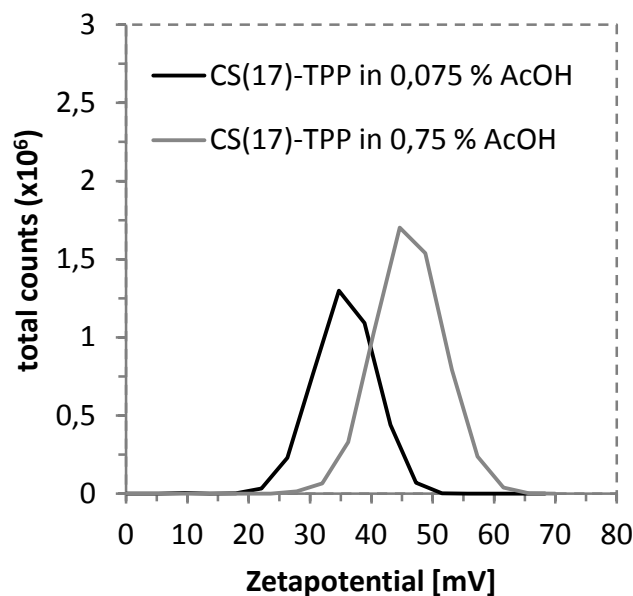


Abbildung 4.2: Zetapotentialmessung von zwei Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikelsuspensionen mit unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen.

Auch das Partikelverhalten während einer Titration ins Basische wurde untersucht, da die Nanopartikel als Folge einer *in vitro* oder *in vivo* Applikation im neutralen pH-Bereich über-

führt werden. In Abbildung 4.3 ist die Titration von CS(17)-TPP 3:1 Nanopartikeln mit Natronlauge in einem Bereich von pH 3,7-7,9 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass mit zunehmendem pH-Wert die Größe der Nanopartikel zunimmt und das Zetapotential abfällt. Dies ist zu erwarten, da mit der Zunahme des pH-Werts der kationische Charakter des Chitosans abnimmt und somit das Zetapotential und die interpartikuläre Abstoßung sinken. Dadurch kann es zur Ausbildung größerer Partikelaggregate kommen. Von GAN et al. wurden ähnliche Untersuchungen zum Verhalten von Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln bei wechselndem pH-Wert unter Betrachtung anderer Mischungsverhältnisse publiziert.^[40] Der Trend dieser Untersuchungen stimmt mit den hier gezeigten Ergebnissen überein. Zu erwähnen ist jedoch, dass der in Abbildung 4.3 gezeigte und zu erwartende starke Abfall des Zetapotentials mit zunehmendem pH-Wert nicht für alle untersuchten Proben so ausgeprägt war. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die vom Gerät automatisch durchgeführt Zirkulation der Messlösung, also auch die Durchmischung, häufig unzureichend ist. Die schlechte Durchmischung hat dabei zur Folge, dass die für einen Messpunkt erhaltenen Messdaten anstatt eines pH-Wertes einen pH-Bereich wiedergeben, keine Ergebnismittellung ermöglichen und dementsprechend ungenau sind.

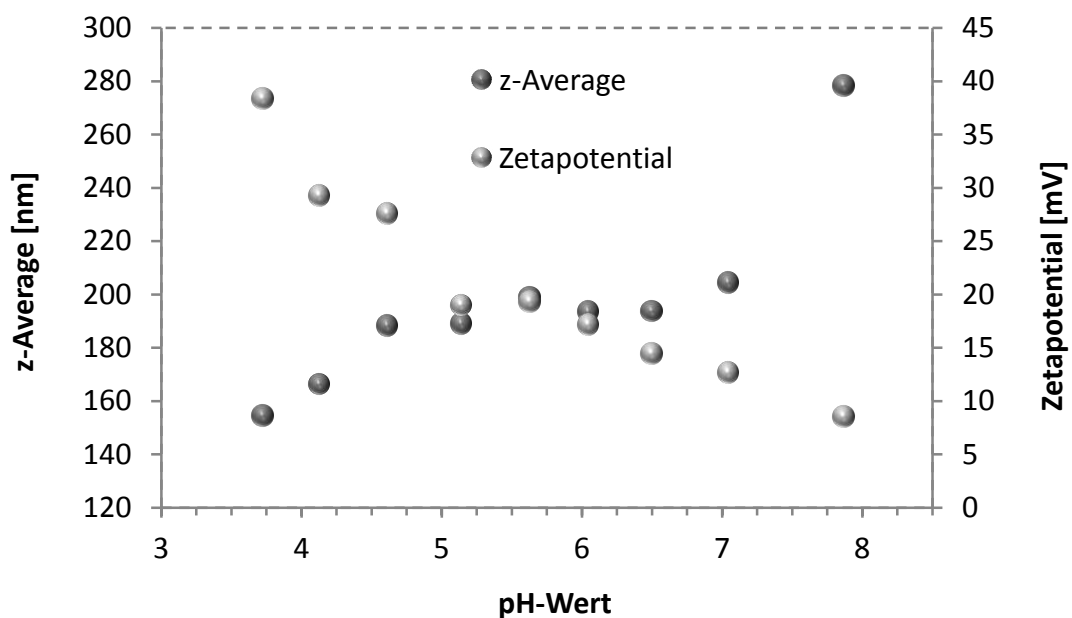


Abbildung 4.3: pH-Titration einer Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikel-suspension mit Natronlauge von pH 3,7-7,9.

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden CS(17)-TPP 3:1 Nanopartikel in 0,75 %-iger Essigsäure verwendet, da die enger verteilten Partikel in milderer Umgebung

(0,075 % Essigsäure) erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit hergestellt wurden. Das Mischungsverhältnis und die Lösungskonzentrationen wurden aus Untersuchungen von GAN et al. zur Freisetzung von bovines Serumalbumin (BSA) aus CS-TPP Nanopartikeln übernommen. Dort zeigten Lösungskonzentrationen (CS und TPP) von 1 mg/mL und ein Mischungsverhältnis von 3:1 die höchsten Werte für Proteineinlagerung und –freisetzung.^[41]

4.1.2 Beschichtungen

Für den Einsatz als Hüftimplantatbeschichtung müssen sich die hergestellten Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel zum Beschichten von Titansubstraten eignen. Die Methode des Spincoatings stand zur Auswahl, wurde jedoch von vornherein ausgeschlossen, da diese Methode für wässrige Systeme nur bedingt geeignet ist. Darüber hinaus ist das Spincoating für komplexe Implantatgeometrien schwer anzuwenden und führt zum Verlust eines Großteils der zur Beschichtung verwendeten Partikellösung, also auch des Wirkstoffs, während des Prozesses. Als Beschichtungsverfahren wurden zunächst die Tauchbeschichtung und eine Lagerung in der Nanopartikelsuspension in Betracht gezogen, da als mögliche Immobilisierungsmechanismen die Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Nanopartikeln und der partiell negativ geladenen Titanoberfläche und/oder die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Tripolyphosphat und Titan in Frage kamen, siehe Kapitel 3.4.2. Über eine Tauchbeschichtung ließen sich nur für extrem lange Eintauchzeiten von bis zu 72 Stunden über die Evaporation des Wassers der Nanopartikelsuspension Beschichtungen herstellen. Diese Methode wurde aufgrund der Erzeugung ungleichmäßiger Filme, der langen Beschichtungsdauer und des hohen Bedarfs an Partikelsuspension als nicht geeignet erachtet. Die Lagerung von Titansubstraten in der Nanopartikelsuspension für bis zu 72 Stunden hatte keine Ausbildung relevanter Schichten zur Folge. Durch Reduktion des Lösungsvolumens und eine offene Lagerung konnten hier, wie zuvor bei der Tauchbeschichtung, über das Auftrocknen der Lösung schwer zu charakterisierende, dicke Filme erhalten werden. Somit deuteten die Ergebnisse der Beschichtungsversuche darauf hin, dass sich ein gezielter Auftrocknungsprozess gut zur Herstellung von Beschichtungen aus Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln eignen könnte.

Die daraufhin getestete und in dieser Arbeit verwendete Sprühbeschichtung ermöglicht das Auftrocknen der Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikel in kurzer Zeit mit sehr geringem Lösungsverlust in beliebig wählbaren Schichtdicken. In Abbildung 4.4 sind ein unbeschichtetes und ein über Sprühbeschichtung beschichtetes Titanplättchen gezeigt. Für die Beschich-

tung wurde eine CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikelsuspension für drei Minuten (ca. 20 μ L) auf das Titanplättchen aufgesprüht.

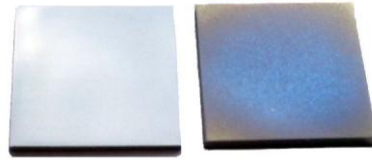


Abbildung 4.4: Visueller Vergleich eines unbeschichteten, polierten Titansubstrats (links) und eines mit Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln sprühbeschichteten Titanplättchens (rechts).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Beschichtung mit der Nanopartikelsuspension eine Verfärbung der Titanoberfläche nach sich zieht. Die unterschiedliche Färbung des Plättchens, innen blau und außen gelb, ist dabei auf die manuelle Durchführung der Sprühbeschichtung zurückzuführen, die über das Aufsprühen mit kreisenden Bewegungen zu leicht höheren Schichtdicken im Zentrum des Plättchens führt. Die über Lichtbrechung erzeugte Farbe ist dabei schichtdickenabhängig und verändert sich während des Sprühprozesses.

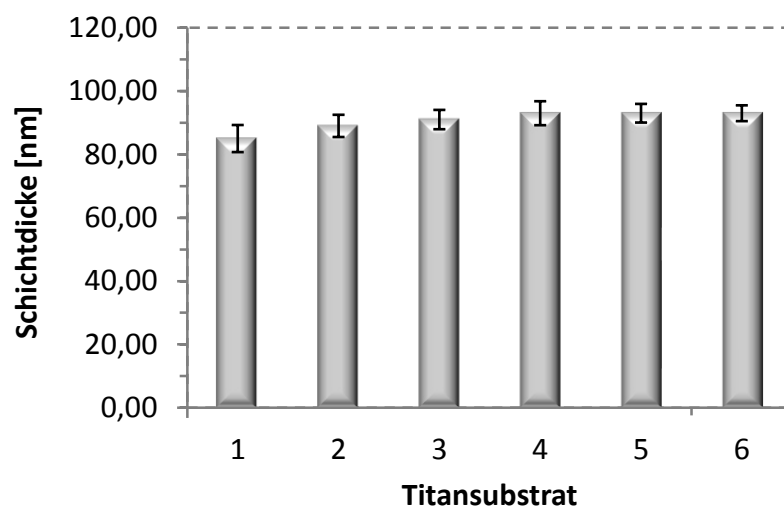


Abbildung 4.5: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken einer Titanprobenreihe nach dreiminütiger Sprühbeschichtung mit einer Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikelsuspension.

Die ellipsometrische Charakterisierung einer Probenreihe bestehend aus sechs Titanplättchen ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Titansubstrate wurden jeweils für drei Minuten mit einer CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikelsuspension besprüht, anschließend in Millipore Wasser geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und abschließend am

Ellipsometer untersucht. Die Messungen¹¹ ergaben Schichtdicken zwischen 85-93 nm mit einer maximalen Standardabweichung von 5 nm auf jedem Plättchen. Dies verdeutlicht, dass sich Titansubstrate reproduzierbar mit CS-TPP Nanopartikeln beschichten lassen und selbst bei manueller Durchführung nur geringe Schichtdickenunterschiede innerhalb eines Plättchens und zwischen verschiedenen Plättchen auftreten. Die Versuche zur Charakterisierung der Beschichtungen via Kontaktwinkelmessungen erwiesen sich als nicht praktikabel, da die CS-TPP Nanopartikel vermutlich aufgrund ihres hydrophilen Gelcharakters Wasser aufnehmen. Somit verlaufen nach der ersten Messung alle weiteren auf der Oberfläche platzierten Wassertropfen in die Position des ersten Tropfens. Dementsprechend konnten keine reproduzierbaren Kontaktwinkelmessungen durchgeführt werden.

Neben der reinen Schichtdickenbestimmung wurden die hergestellten Beschichtungen auch hinsichtlich ihrer Stabilität in unterschiedlichen Medien charakterisiert. In Abbildung 4.6 sind die Schichtdicken von Titansubstraten, die mit einer CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikelsuspension beschichtet wurden, während der Lagerung¹² in Millipore Wasser und „phosphate buffered saline“ (PBS) bei 37 °C aufgetragen.

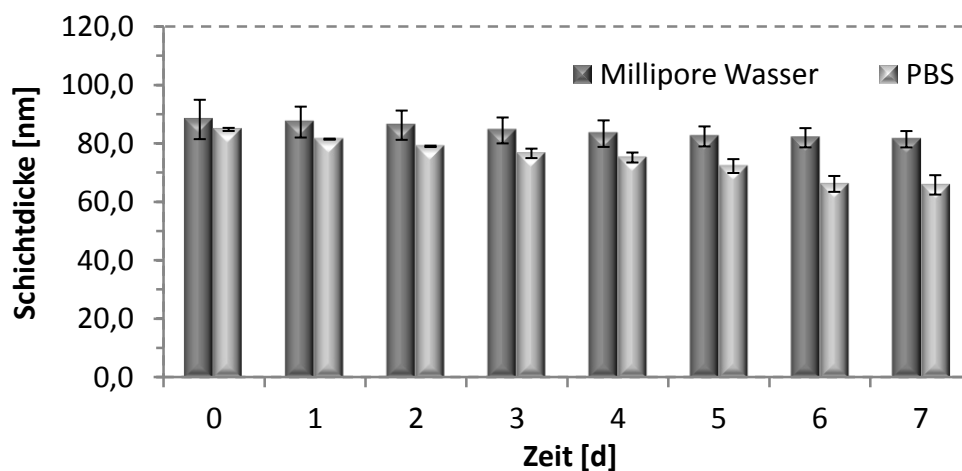


Abbildung 4.6: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten zur Aufzeichnung der Beschichtungsstabilität während der Inkubation in Millipore und PBS bei 37 °C; je 3 Titanplättchen jeweils 3 Minuten sprühbeschichtet.

¹¹ 16 verschiedene Messpunkte auf jeder beschichteten Titanprobe.

¹² Die Plättchen werden in dem jeweiligen Medium gelagert und für die Messung entnommen und getrocknet.

In Millipore blieben die Beschichtungen nahezu unverändert, wohingegen die in PBS gelagerten Proben eine langsame Abnahme der Schichtdicke innerhalb einer Woche aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beschichtungen der Titansubstrate mit CS(17)-TPP in Millipore aufgrund der schlechten Löslichkeit von CS(17), das nur im sauren pH-Bereich löslich ist, stabil zu sein scheinen. Darüber hinaus scheint PBS über seinen ionischen Charakter die Dissoziation der Beschichtungen in die Flüssigkeit zu begünstigen. In einigen Fällen konnte jedoch auch für Millipore ein langsames Auflösen und für PBS keine Veränderung an der Beschichtung beobachtet werden. Woran dieses abweichende Verhalten mancher Probenreihen lag, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.1.3 *In vitro* Studien: BSA und BMP-2¹³

Als Ausgangspunkt für die *in vitro* Experimente wurde die Einlagerung und Freisetzung von BSA im CS(17)-TPP Partikelsystem mit Hilfe eines BCA-Assays¹⁴ quantifiziert, um Erfahrungen mit dem Nanopartikelsystem zu sammeln und einen Vergleich mit der Literatur durchführen zu können. Hierzu wurde vor der Partikelbildung eine definierte Menge BSA mit der Chitosan Lösung bei pH 5,5 mit AcOH nach GAN et al. vermischt.^[41] Anschließend erfolgte die Partikelbildung zu CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL) beladen mit BSA über die Zugabe von Tripolyphosphat. Nach Abzentrifugation der Nanopartikel ergab sich über die Quantifizierung der im Überstand verbliebenen Proteinmenge eine Einlagerungseffizienz von ca. 20 % in Bezug auf die jeweils eingesetzte BSA-Menge. Somit war die beobachtete Einlagerungseffizienz unabhängig von den verwendeten BSA-Konzentrationen von 0,5 mg/mL und 1 mg/mL. Verglichen mit den von GAN et al. erhaltenen Ergebnissen (ca. 90 % Einlagerungseffizienz), fällt die Einlagerungseffizienz für BSA hier sehr gering aus. Auch der Vergleich der in Abbildung 4.7 dargestellten Freisetzung des Proteins über die Zeit ist mit 40-60 % niedriger als die Angaben von GAN et al. mit bis zu 90 %.^[41]

¹³ Assays zur Proteinquantifizierung wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung im Arbeitskreis von Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross von Dr. Virginia Seiffart und Inge Hollatz-Rangosch durchgeführt.

¹⁴ Photometrische Proteinquantifizierung über eine Farbreaktion.

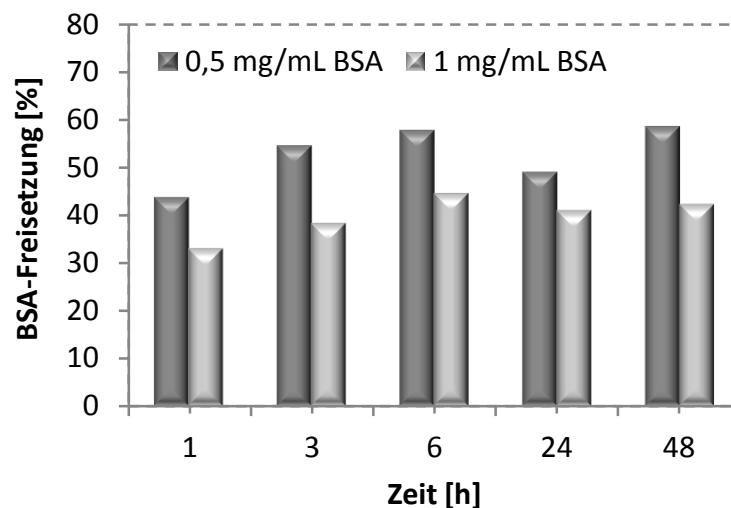


Abbildung 4.7: BSA-Freisetzung aus CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, DA 17 %) Nanopartikeln für zwei verschiedene BSA-Konzentrationen bei 37 °C in PBS.

Ein möglicher Grund für die Unterschiede ist, dass in dieser Arbeit im Vergleich zu den Untersuchungen von GAN et al. Chitosan mit einem anderen Acetylierungsgrad und Molekulargewicht verwendet wurde.^[41] Hauptverantwortlich für die große Abweichung der Einlagerungseffizienz ist aber sehr wahrscheinlich die Durchführung der Partikelbildung in Glaszentrifugenröhrchen, da Proteine mit einer hohen Affinität an Glasoberflächen adsorbieren und das BSA somit der Partikellösung entzogen wurde. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Einlagerung von BSA in CS(17)-TPP möglich ist. Auch die auf Diffusion basierende Freisetzung des Proteins aus den Nanopartikeln konnte nachvollzogen werden.

In Freisetzungsversuchen von BMP-2 aus CS(17)-TPP Nanopartikeln konnten sehr hohe Einlagerungseffizienzen von ca. 98 % erreicht werden. Die hohe Einlagerungseffizienz im Vergleich zum BSA ist möglicherweise auf die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (IEP) und Strukturen der Proteine zurückzuführen. Die Untersuchung der Freisetzungskinetik (Quantifizierung mittels ELISA¹⁵) führte zu dem Ergebnis, dass es zu keiner nennenswerten Freisetzung von BMP-2 aus den CS-TPP Nanopartikeln kommt. Es konnten nur bis zu 2 % des eingelagerten BMP-2 über Diffusion freigesetzt werden. Grund hierfür ist womöglich die positive Ladung des BMP-2. Mit einem IEP von 8,5^[8] ist BMP-2 während der Partikelbildung und der Proteinfreisetzung positiv geladen und wird vermutlich wie das Chitosan in die her-

¹⁵ „enzyme linked immunosorbent assay“: photometrische Proteinquantifizierung

gestellten Partikel eingebaut. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass das Partikelinnere negativ geladen ist und somit umso besser das positiv geladene Protein in den Partikeln halten kann. Die Annahme der negativen Ladung des Partikelinneren resultiert aus Berechnungen zu den Ladungsverhältnissen der einzelnen Komponenten der Partikel und den zuvor dargestellten Ergebnissen zum Zetapotential der Partikel: Unter Verwendung einer Essigsäurekonzentration von ca. 0,13 mol/L (1 %-ige AcOH) wird davon ausgegangen, dass Chitosan vollständig protoniert ist. Laut RINAUDO et al. ist dies ab einer Essigsäurekonzentration von 0,01 mol/L für ca. 1,2 mg/mL Chitosan der Fall.^[107] Tripolyphosphat wird als vierfach negativ geladen angenommen, da nach MI et al. die Protonierungsstufen $P_3O_{10}^{5-}$, $HP_3O_{10}^{4-}$ und $H_2P_3O_{10}^{3-}$ in allen pH-Bereichen nebeneinander vorliegen.^[108] Somit können für eine bekannte Partikelzusammensetzung näherungsweise die Ladungsverhältnisse berechnet werden. Im Folgenden wird eine Berechnung für einen Milliliter einer CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikelsuspension durchgeführt. Die Einheit „monomol“ steht dabei für eine Monomereinheit des Polysaccharids. Für CS(17) ergibt sich über den Acetylierungsgrad ein durchschnittliches Monomereinheitsgewicht von 168,34 g/monomol.

$$0,75 \text{ mL CS} \equiv 0,75 \text{ mg CS} \equiv \frac{0,75 \text{ mg}}{168340 \frac{\text{mg}}{\text{monomol}}} = 4,46 \times 10^{-6} \text{ monomol CS}$$

0,75 mg Chitosan (DA 17 %) entsprechen also $4,46 \times 10^{-6}$ mol Glucosamin- und N-Acetylglucosamineinheiten. Da jedoch nur die Glucosamineinheiten protonierbar sind, folgt für die Zahl der positiven Ladungen:

$$\begin{aligned} \text{Glucosamin} &\equiv \text{positive Ladung} = 4,46 \times 10^{-6} \text{ monomol} \times 0,83 \\ &= 3,70 \times 10^{-6} \text{ monomol} \end{aligned}$$

Für Natriumtripolyphosphat mit einem Molekulargewicht von 367,86 g/mol ergibt sich:

$$0,25 \text{ mL TPP} \equiv 0,25 \text{ mg TPP} \equiv \frac{0,25 \text{ mg}}{367860 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 6,80 \times 10^{-7} \text{ mol TPP}$$

Da jedes Tripolyphosphatmolekül wie zuvor besprochen als vierfach negativ geladen angenommen wird, ergibt sich für die Anzahl negativer Ladungen:

$$\text{Tripolyphosphat} \equiv \text{negative Ladung} = 6,80 \times 10^{-7} \text{ mol} \times 4 = 2,72 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Somit ist trotz des 3:1 Überschusses von Chitosan zu Tripolyphosphat das Ladungsverhältnis fast ausgeglichen. Wie anhand der nachfolgend diskutierten CS(42)-TPP Nanopartikel (aus acetyliertem, aufgereinigtem Chitosan (DA 42 %)) verdeutlicht wird, lässt sich das stark positive Zetapotential von ca. +46 mV der CS(17)-TPP Nanopartikel nicht auf einen positiven Ladungsüberschuss zurückführen, da auch für CS(42)-TPP Partikel ein positives Zetapotential trotz eines Überschusses an negativen Ladungen detektiert wird. Das Ladungsverhältnis der CS(42)-TPP Nanopartikel soll hier kurz für CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) mit einem CS(42)-Monomereinheitsgewicht von 178,80 g/mol berechnet werden.

$$\begin{aligned} \text{positive Ladung} &\equiv \frac{0,75 \text{ mg}}{178800 \frac{\text{mg}}{\text{monomol}}} \times 0,58 = 2,43 \times 10^{-6} \text{ monomol} \\ \text{negative Ladung} &\equiv \frac{0,25 \text{ mg}}{367860 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} \times 4 = 2,72 \times 10^{-6} \text{ mol} \end{aligned}$$

Der Vergleich der Ladungsverhältnisse und Zetapotentiale deutet darauf hin, dass es innerhalb der Partikel eine Art Verteilungsgradienten gibt und sich im äußeren Bereich der Partikel mehr Chitosan und im inneren Bereich mehr Tripolyphosphat befindet. Dies würde das Einbinden von BMP-2 in die Nanopartikel über ionische Wechselwirkungen begünstigen und erklären wieso die Freisetzung über Diffusion aus den Partikeln im Vergleich zu BSA mit einem IEP von 4,7^[109] so stark inhibiert ist.

4.1.4 Überblick: Chitosan (17) - Tripolyphosphat Nanopartikel

Die Herstellung von CS(17)-TPP Nanopartikeln wurde nach Vorschriften aus der Literatur durchgeführt und lieferte über ein CS-TPP Mischungsverhältnis von 3:1 in 0,075 %iger Essigsäure nahezu monomodale Partikelverteilungen (z-Average 170 ± 92 nm) mit einem geringen PDI (0,29) und positivem Zetapotential (+36 mV). CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikel wurden via Sprühbeschichtung zur kontrollierten Beschichtung von Titansubstraten verwendet. Die erhaltenen Beschichtungen wurden mittels Ellipsometrie als

homogen und reproduzierbar charakterisiert (ca. 90 ± 5 nm). Des Weiteren konnte über die Lagerung unter körperähnlichen Bedingungen (PBS bei 37 °C) gezeigt werden, dass die Beschichtungen stabil sind. Abschließend wurden *in vitro* Studien mit BSA und BMP-2 durchgeführt. Im Fall von BSA konnte eine Einlagerung mit niedriger Effizienz (20 %) und eine anschließende Freisetzung von 40-60 % über Diffusion via BCA-Assay gezeigt werden. Für BMP-2 wurden Einlagerungseffizienzen von über 98 % erreicht. Jedoch konnte mittels ELISA für BMP-2 keine Freisetzung über Diffusion aus den Nanopartikeln festgestellt werden. CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikel eignen sich dementsprechend nicht zur schnellen Freisetzung von biologisch aktivem BMP-2 von einer Implantatoberfläche zur effektiven Unterstützung von Osteoblasten im „race for the surface“.

4.2 Chitosan (42) - Tripolyphosphat Nanopartikel

Als Teil der in Kapitel 3.2 vorgestellten Mechanismen der Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanopartikeln wurden neben der Diffusion noch die Desorption und die Degradation angesprochen. Da die Desorption des BMP-2 von den Nanopartikel prinzipiell schon vor einer Freisetzung über Diffusion erfolgt, wurde versucht das zuvor beschriebene CS(17)-TPP System biologisch abbaubar zu gestalten. Die Wirkstofffreisetzung ist in diesem Fall über die Degradation des Nanopartikelsystems angedacht.

Um aus dem CS(17)-TPP System ein biodegradables System zu erhalten, muss die Hauptkomponente des Nanopartikelsystems, das Chitosan, biologisch abbaubar sein. Der Abbau von Chitosan findet im menschlichen Körper hauptsächlich durch das Enzym Lysozym statt.^[43,45,110] Die Degradationsrate hängt dabei nach FREIER et al. stark vom Acetylierungsgrad des Chitosans ab und ist in einem Bereich von ca. 40-60 % DA maximal.^[45] Für Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von 17 % wird hingegen eine sehr niedrige Abbaugeschwindigkeit prognostiziert. Untersuchungen zur Degradation von CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln, siehe Abbildung 4.8, wurden über die Zugabe von Lysozym zu der Nanopartikelsuspension bei 37 °C durchgeführt. Die Lysozymkonzentration wurde hierbei auf 1,5 µg/mL eingestellt, was nach BROUWER et al. der Konzentration von Lysozym in humanem Serum entspricht.^[53]

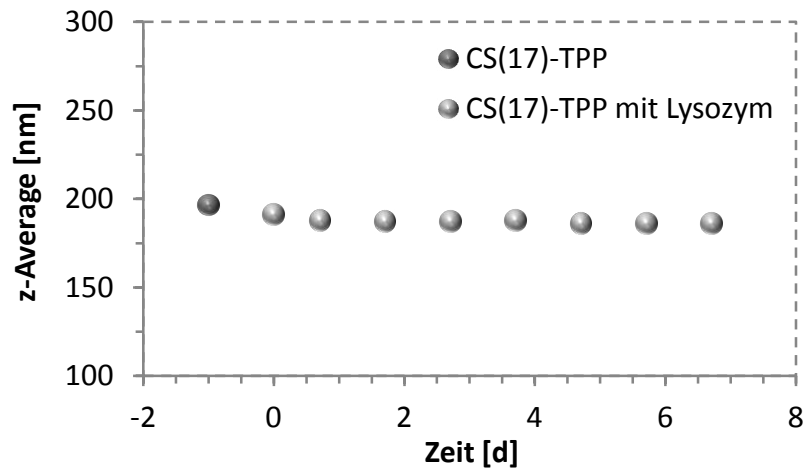
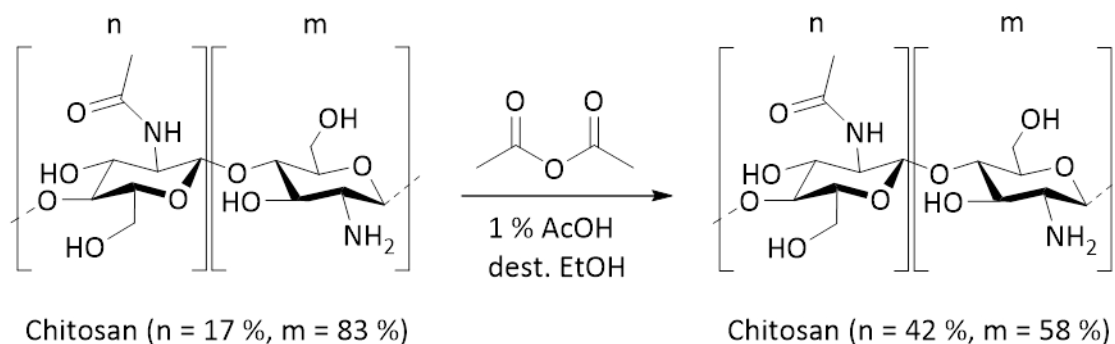


Abbildung 4.8: Partikelgrößenmessung von CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 17 %) Nanopartikeln bei 37 °C während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym.

In Abbildung 4.8 ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von Lysozym keine signifikante Zu- oder Abnahme der Partikelgröße zur Folge hat. Da sich auch im Verlauf der Messung nach bis zu sieben Tagen keine Veränderung für Partikelgröße und PDI ergaben, wurde die Messung gestoppt. Die Annahme, dass CS(17)-TPP Nanopartikel nur sehr langsam bzw. gar nicht von Lysozym abgebaut werden, konnte dementsprechend bestätigt werden. Es ist jedoch zu erwarten, dass die Partikel im Körper im Laufe der Zeit langsam enzymatisch oder hydrolytisch abgebaut werden.

Um eine Wirkstofffreisetzung über die Degradation des CS-TPP Partikelsystems zu ermöglichen, scheint somit eine Acetylierung des aufgereinigten CS(17) auf einen Acetylierungsgrad zwischen 40-60 % notwendig zu sein. Die Acetylierung von CS(17) wurde in Anlehnung an die Arbeiten von FREIER et al. mit Essigsäureanhydrid durchgeführt und lieferte nach Aufreinigung über Dialyse ein Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von 42 % (via $^1\text{H-NMR}$).^[45]



Zur Überprüfung der Biodegradabilität des CS(42) wurden Viskosimetriemessungen eingesetzt. Hierfür wurde eine viskose Chitosanlösung (10 mg/mL) in 0,1 %-iger Essigsäure angesetzt und mit Lysozym versetzt (1,5 µg/mL). Bei 37 °C wurde die Durchlaufzeit (t) in einer Kapillare von einem Viskosimeter erfasst und über Gleichung 4.1 zur Berechnung der kinematischen Viskosität (ν) verwendet.

Gleichung 4.1

$$\nu = K \times t$$

mit $K = 0,3$ als Instrumentenkonstante der Kapillare. Die Auftragung der erhaltenen kinematischen Viskosität der Chitosanlösung ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

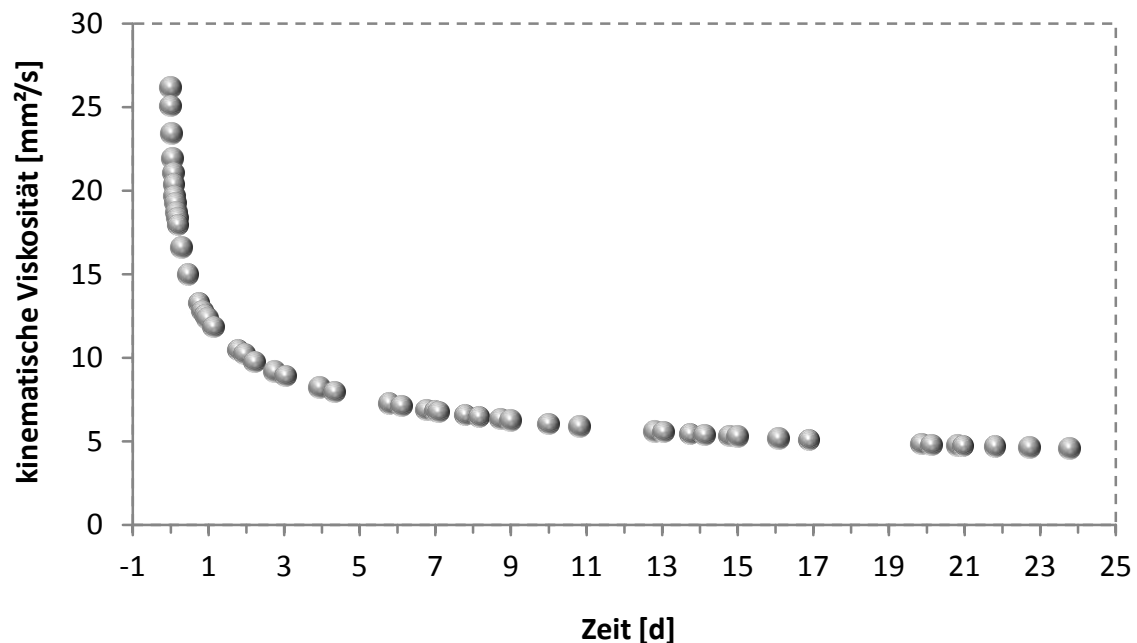


Abbildung 4.9: Messung der kinematischen Viskosität einer 10 mg/mL Chitosanlösung (DA 42 %) in 0,1 %-iger Essigsäure während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym bei 37 °C.

Die Messung der kinematischen Viskosität während der Degradation mit Lysozym führt zu einer anfangs sehr schnellen Abnahme der Viskosität. Mit der Zeit nimmt die Viskosität immer langsamer ab, bis nach einer Messdauer von 24 Tagen die Aufzeichnung weiterer Daten beendet wurde. Innerhalb der ersten 24 Stunden wurde die kinematische Viskosität der Lösung mehr als halbiert, von 26 mm²/s auf 12 mm²/s. Am letzten Messpunkt betrug die kinematische Viskosität nur noch 4,6 mm²/s und wurde somit insgesamt um 84 % reduziert. Die Viskositätsabnahme ist auf die Verringerung des Molekulargewichtes des Chitosans zurück-

zuführen und bestätigt folglich, dass Lysozym in der Lage ist das hergestellte CS(42) abzubauen. Dies konnte auch von VÅRUM et al. in Degradationsuntersuchungen an Chitosan in humanem Serum mittels Viskosimetrie gezeigt werden.^[111]

Trotz zahlreicher Veröffentlichungen auf diesem Gebiet, die belegen, dass für CS(17) keine oder eine nur sehr langsame Degradation zu beobachten sein sollte, wurde das aufgereinigte CS(17) unter den gleichen Bedingungen wie das CS(42) untersucht. Die langsame Degradation von hoch deacetylierten Chitosanen wird von FREIER et al.^[45] und TOMIHATA et al.^[112] für Chitosanfilme, von REN et al. für Chitosan-„Scaffolds“^[113] und von NORDTVEIT et al. für Chitosan in Lösung^[114,115] beschrieben. Die in dieser Arbeit durchgeführten viskosimetrischen Messungen ergaben jedoch den in Abbildung 4.10 gezeigten schnellen Abbau von CS(17) durch Lysozym.

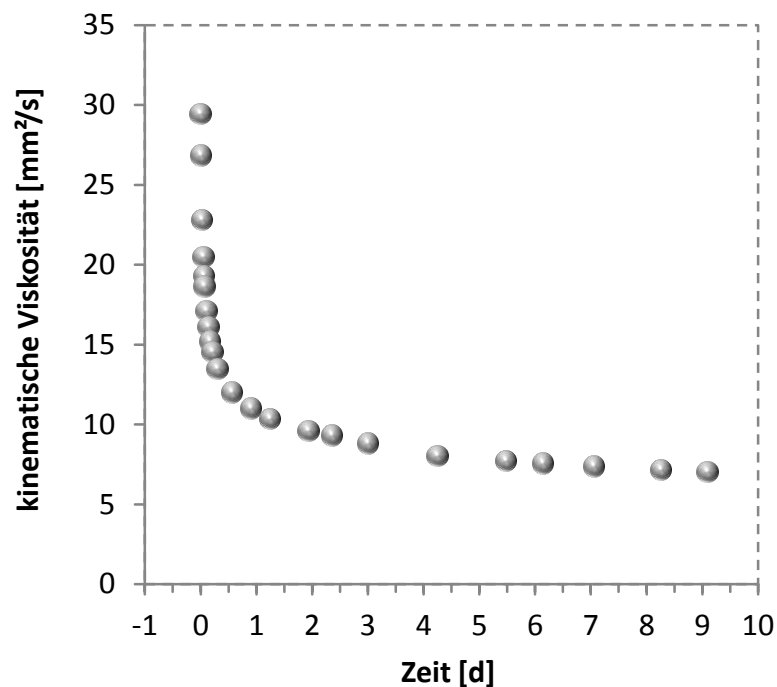


Abbildung 4.10: Messung der kinematischen Viskosität einer 10 mg/mL Chitosanlösung (DA 17 %) in 0,1 %-iger Essigsäure während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym bei 37 °C.

Der Abbau von CS(17) zeigt einen nahezu identischen Verlauf wie der Abbau des zuvor untersuchten CS(42). Um auszuschließen, dass die Aufreinigung des Chitosans diesen Effekt verursacht, wurde auch das unbehandelte, vom Hersteller erhaltene Chitosan, siehe Kapitel 8.1, untersucht. Auch für dieses Material wurde eine sehr schnelle Abnahme der Viskosität registriert. In weiteren Untersuchungen wurde getestet, ob der beobachtete Effekt von der verwendeten Chitosan-Charge abhängt. Dies konnte nicht bestätigt werden, da auch für

eine andere Charge vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. Zusätzliche viskosimetrische Messungen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Nordtveit et al.^[114] an niedriger konzentrierten (3 mg/mL statt 10 mg/mL) und damit weniger viskosen CS(17) und CS(42) Lösungen mit 1,5 µg/mL Lysozym und 0,1 M Natriumchlorid in Essigsäure-Acetatpuffer bei pH 4,65 durchgeführt. Jedoch konnte auch in diesen Experimenten kein signifikanter Unterschied in den Viskositätsabnahmen der beiden Polysaccharide festgestellt werden. In Messungen ohne Lysozym konnte darüber hinaus eine viel langsamere Viskositätsabnahme beobachtet werden, weshalb die saure Hydrolyse als Grund für den schnellen Abbau von CS(17) und CS(42) ausgeschlossen werden kann.

Ein möglicher Grund für die Diskrepanz zur Literatur könnte durch unterschiedliche Herstellungsmethoden des Chitosans aus Chitin hervorgerufen werden, welche möglicherweise zu unterschiedlichen Acetylierungssequenzen führen können. Lysozym bindet mit seinem aktiven Zentrum an sechs Zuckerringe und spaltet der Literatur zufolge Chitosan sehr spezifisch zwischen N-Acetylglucosamineinheiten (3-4 acetylierte Zuckereinheiten funktionieren am besten).^[114] Sollte es also zu keiner statistischen, sondern zu einer blockweisen Deacetylierung des Chitins kommen, wäre ein hoch deacetyliertes Chitosan immer noch ein sehr gutes Substrat für Lysozym und würde mit einem DA von 17 % und einem ungefähren Molekulargewicht von 180 kDa über ca. 50 Spaltpositionen mit 3-4 zusammenhängenden N-Acetylglucosamineinheiten verfügen. Dies würde zu einer schnellen Degradation des Chitosans durch Lysozym führen und in einer hohen Viskositätsabnahme resultieren. In einem statistisch deacetylierten Chitosan mit den gleichen Eigenschaften wäre hingegen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Zuckersequenz aus sechs Einheiten mit drei N-Acetylglucosamineinheiten nur 0,13 %. Dementsprechend wäre eine sehr langsame Degradation zu erwarten. Da keine Informationen über die Herstellung des in dieser Arbeit eingesetzten Chitosans vorhanden sind, kann das Vorliegen von N-Acetylglucosaminblöcken im CS(17) als Grund für die hier gezeigten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Weitere mögliche Experimente zur Klärung dieses Sachverhalts werden im Ausblick dieses Kapitels angesprochen.

--- Eine nachträglich durchgeführte Modellrechnung zeigt, dass CS(17) über ausreichend acetylierte Glucosamineinheiten verfügt, um die gemessene Viskositätsabnahme zu erklären. Siehe hierzu die im Anhang angefügten Berechnungen und Erklärungen.¹⁶ ---

Die Unterschiede der viskosimetrischen Messungen von CS(17) zum nicht eintretenden Abbau der CS(17)-TPP Nanopartikel sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass CS(17) durch die Interaktion mit dem Tripolyphosphat für das Lysozym nicht zugänglich ist. Dies ist dem hohen Deacetylierungsgrad des Chitosans und dem nahezu ausgeglichenen Ladungsverhältnis in den Partikeln geschuldet. Somit stehen viele protonierte Glucosamineinheiten zu Verfügung, die mit dem zugegebenen Tripolyphosphat wechselwirken können. Dies führt wahrscheinlich dazu, dass die hexamere Bindungsstelle des Lysozyms keinen Zugriff auf das Polysaccharid hat. Für die BMP-2 Freisetzung aus den CS-TPP Nanopartikeln ist, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, nur das Degradationsverhalten der Partikel von Belang. Deshalb wurde das Chitosan CS(42) hinsichtlich Partikelbildung und –degradation charakterisiert, um zu evaluieren, ob hier ein biodegradables Nanopartikelsystem erhalten wird.

4.2.1 Partikelcharakterisierung: CS(42)-TPP

Für die Herstellung von CS(42)-TPP Nanopartikeln wurden verschiedene Mischungsverhältnisse zwischen Chitosan und Tripolyphosphat untersucht, um eine Partikelzusammensetzung mit einem niedrigen PDI zu ermitteln, die sich leicht charakterisieren lässt. Wie für die CS(17)-TPP Nanopartikel ergaben sich für die CS(42)-TPP Mischungsverhältnisse 2:1 und 3:1 die homogensten Partikelverteilungen. In Abbildung 4.11 sind CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL) für zwei verschiedene Essigsäurekonzentrationen (0,075 % und 0,75 %) gezeigt. Eine geringere Säurekonzentration führt auch hier wieder zu einem niedrigeren PDI (0,23 im Vergleich zu 0,32). Der z-Average der CS(42)-TPP Nanopartikel in 0,075 % Essigsäure liegt mit einer einheitlichen Verteilung bei 148 nm (± 72). Für 0,75 % Essigsäure ist eine bimodale Verteilung zu sehen, die einen großen Anteil kleiner Partikel im Bereich von ca. 40 nm aufweist und einen z-Average von 186 nm (± 106) hat.

¹⁶ Die Modellrechnung und deren Ergebnisse wurden nach der Einreichung der Dissertation in Vorbereitung auf die Diskussion in der Disputation erarbeitet. Die Ergebnisse werden hier auf Wunsch des Mentors Prof. Dr. Henning Menzel eingefügt.

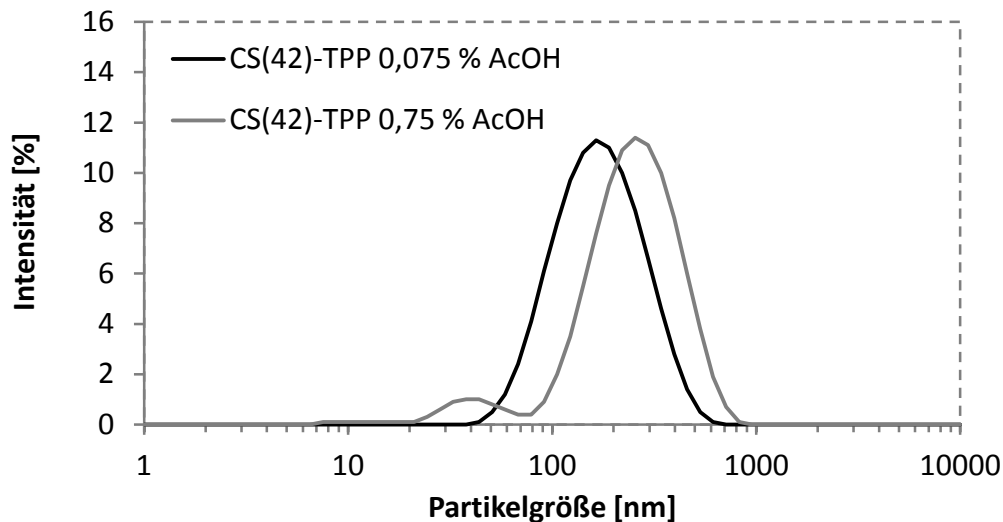


Abbildung 4.11: Partikelgrößenverteilung von zwei Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionen mit unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen.

Eine Erhöhung des Mischungsverhältnisses über 3:1 hinaus resultiert in Übereinstimmung mit Arbeiten von PURSHAHAB et al., der allerdings Chitosan mit einem anderen Acetylierungsgrad verwendete, in einer Verbreiterung der Partikelverteilung und einer Zunahme des z-Averages.^[116] Darüber hinaus wird auch das Zetapotential der Nanopartikel aufgrund eines höheren Chitosananteils gesteigert. In Abbildung 4.12 ist das Zetapotential von CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL) Nanopartikeln in 0,075 % und 0,75 % Essigsäure dargestellt. Die Ergebnisse zeigen erneut, dass eine höhere Säurekonzentration im Falle der CS-TPP Nanopartikel auch ein höheres Zetapotential bedingt. Für CS(42)-TPP in 0,075 % Essigsäure wurde ein Zetapotential von +22,8 mV ($\pm 4,8$) erhalten, wohingegen für die Partikel in 0,75 % Essigsäure ein Wert von +28,5 mV ($\pm 4,5$) gemessen wurde.

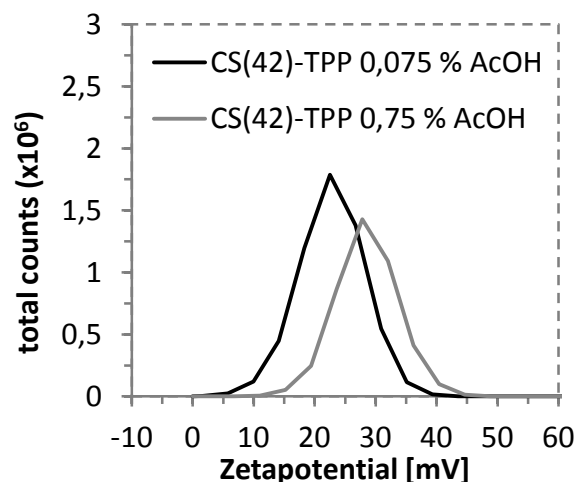


Abbildung 4.12: Zetapotentialmessung von zwei Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionen mit unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen.

Aufgrund der milderen Partikelbildungsbedingungen in 0,075 % Essigsäure und der homogenen Partikelverteilung, siehe Abbildung 4.11, wurden die CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel für die nachfolgenden *in vitro*-, *in vivo*- und Beschichtungsversuche verwendet. Wie jedoch in Kapitel 7.1.3 zu den Grundlagen der dynamischen Lichtstreuung beschrieben wird, ist der ungefähre Wert des Zetapotentials für ein stabiles Partikelsystem ± 30 mV.^[117] Da das Zetapotential für die CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel nur bei ca. 23 mV liegt, wurde die Stabilität der Partikelsuspension bei Raumtemperatur über eine Dauer von zwei Wochen mittels dynamischer Lichtstreuung verfolgt. In Abbildung 4.13 sind die gemittelten Partikelgrößen der einzelnen Partikelgrößenverteilungen gegen die Lagerungszeit dargestellt.

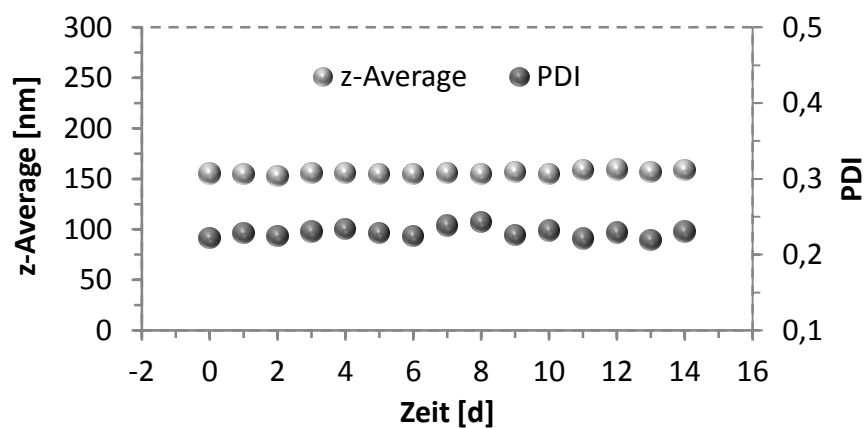


Abbildung 4.13: Test der Partikelsuspensionsstabilität von CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 20 °C.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Lagerung bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) von bis zu 14 Tagen keinen Einfluss auf die Partikelsuspension hat. In den Daten konnten keine Veränderungen an z-Average und PDI festgestellt werden, die auf Aggregatbildung, Degradation oder Auflösung der Partikel hinweisen würden. Somit wurde die CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension als stabil und für weitere Versuche geeignet eingestuft.

Als wichtigste Eigenschaft der CS(42)-TPP Nanopartikel galt es die Degradierbarkeit des Systems mit körpereigenen Enzymen zu evaluieren, um sicherzustellen, dass eine Wirkstofffreisetzung über den Abbau der Partikel erfolgen kann. Hierzu wurde der CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension Lysozym (1,5 µg/mL) zugesetzt. Bei 37 °C wurden anschließend die Partikelgrößenverteilungen zeitabhängig aufgezeichnet. In Abbil-

Abbildung 4.14 zeigt den z-Average gegen die Degradationsdauer für zwei verschiedene Abbaustudien gezeigt. Für eine Studie wurde Lysozym zu einer bereits ausgebildeten CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension hinzugegeben. In der anderen Studie wurde das Lysozym vor der Partikelbildung mit der Chitosanlösung vermischt und anschließend über die Vernetzung mit Tripolyphosphat in die Nanopartikel eingelagert. Wie hoch der Anteil an eingelagertem und freiem Lysozym bei letzterer Methode ist, wurde nicht quantifiziert.

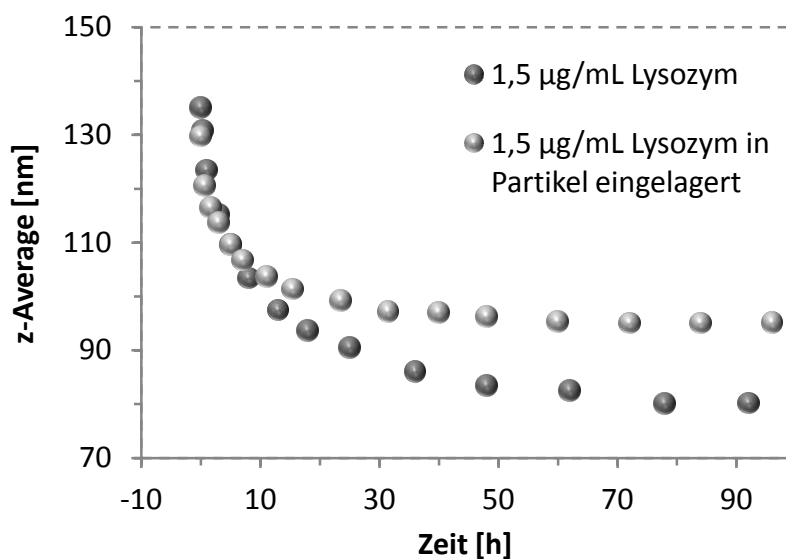


Abbildung 4.14: Partikelgrößenmessung von CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 37 °C während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym.

Der in Abbildung 4.14 dargestellte Kurvenverlauf zeigt für beide Experimente zu Beginn eine sehr ausgeprägte Abnahme des Partikeldurchmessers, die mit zunehmender Versuchsdauer abklingt. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass selbst das eingelagerte Lysozym in der Lage ist das Chitosan der CS-TPP Partikel abzubauen (Reduktion des z-Averages um $\approx 30\%$). Jedoch ist die Degradationseffektivität des freien Lysozyms dem Verlauf nach höher und resultiert in einem niedrigeren z-Average. Für das CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsystem konnte über diese Methode eine Reduktion der Partikelgröße von bis zu 40 % in vier Tagen erreicht werden. Der Partikelabbau ist hier wahrscheinlich aufgrund der reduzierten Zahl an Glucosamineinheiten möglich, da nicht so viele Interaktionsmöglichkeiten mit dem Tripolyphosphat bestehen und somit dem Lysozym mehr Angriffspunkte geboten werden.

Eine weitere Beschleunigung des Partikelabbaus ließ sich über eine Erhöhung der zugegebenen Lysozymmenge erzielen. In Abbildung 4.15 ist der Vergleich der Partikelgrößenabnahme

von CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln mit 1,5 µg/mL Lysozym und 150 µg/mL Lysozym gezeigt. Die erhöhte Lysozymkonzentration hat einen stark beschleunigten Partikelabbau zur Folge und führt bereits nach zehn Stunden zu einer Partikelgrößenreduktion von ca. 50 %.

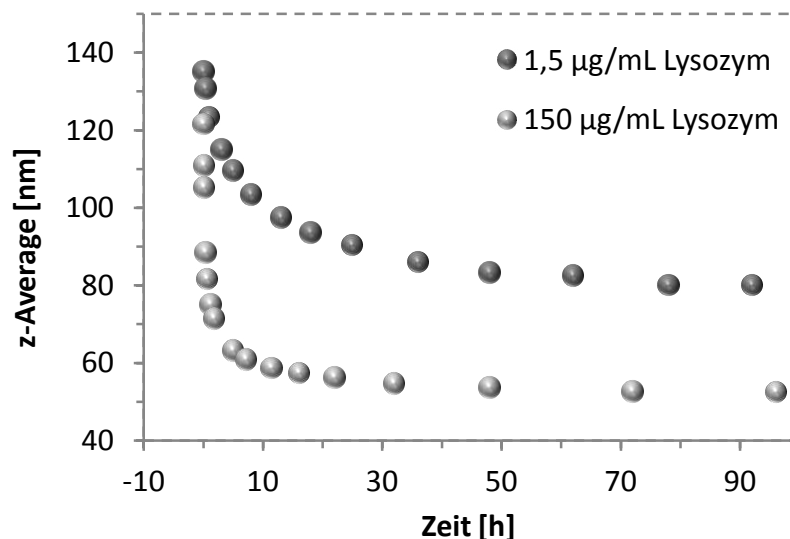


Abbildung 4.15: Partikelgrößenmessung von CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 37 °C während der Degradation mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen.

Um auszuschließen, dass es sich um eine temperaturbedingte Umlagerung oder Zersetzung der CS-TPP Nanopartikel handelt, wurde als Kontrolle eine CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension bei 37 °C gelagert und ohne Enzym gemessen. Dabei wurde der z-Average der Probe für einen Zeitraum von 14 Tagen aufgezeichnet. Die Auftragung der Partikelgrößen über die Lagerungszeit bei 37 °C ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

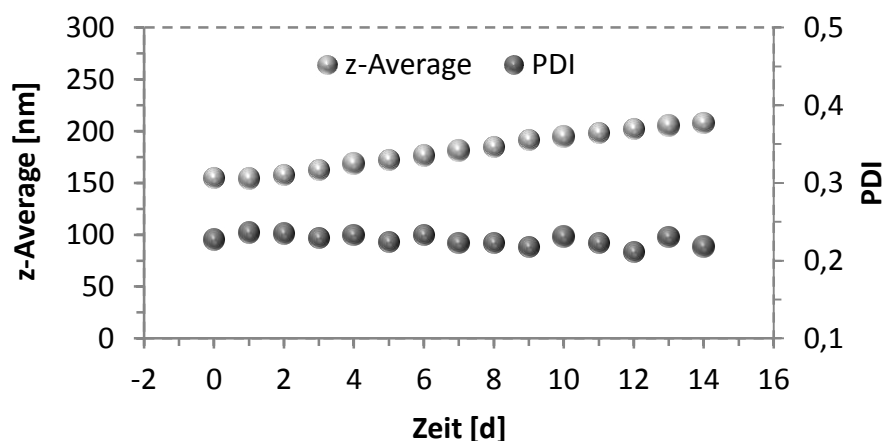


Abbildung 4.16: Test der Partikelsuspensionsstabilität von CS-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 37 °C.

Die Lagerung bei 37 °C hat dem Versuch nach keinen Einfluss auf den PDI der Nanopartikel-suspension. Jedoch nimmt die Größe der Nanopartikel im Verlauf der 14 Tage langsam zu und steigt von ca. 155 nm auf 208 nm an. Dies ist wahrscheinlich auf die langsame Hydrolyse von Chitosan in verdünnter Essigsäure zurückzuführen. Ergebnissen von NGUYEN et al. zufolge ist die Hydrolyse von Chitosan stark temperaturabhängig, was den Unterschied zur Untersuchung bei 20 °C in Abbildung 4.13 erklärt.^[118] Warum die Partikelgröße im Fall der sauren Hydrolyse ein wenig zunimmt und im Fall der enzymatischen Degradation deutlich abnimmt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der Vergleich zeigt aber, dass in den Abbaustudien die Degradierbarkeit von CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln über ein im humanen Organismus vorkommendes Enzym mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen werden konnte. Lysozym wurde dabei in Konzentrationen eingesetzt, die dem Lysozymgehalt von humanem Serum entsprechen.^[53]

4.2.2 Beschichtungen

CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel wurden zur Durchführung von Beschichtungsexperimenten verwendet. Auch hier wurde getestet, ob sich die Nanopartikel mittels Sprühbeschichtung auf Titansubstrate auftragen lassen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der unterschiedlichen Zetapotentiale und Acetylierungsgrade des bereits vorgestellten Systems CS(17)-TPP und des CS(42)-TPP Systems auf die Beschichtungsstabilität untersucht.

Titansubstrate wurden via Sprühbeschichtung mit CS(42)-TPP Nanopartikeln beschichtet. Die erhaltenen Beschichtungen wurden mittels Ellipsometrie, Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie und Raster-Elektronen-Mikroskopie charakterisiert. Der ellipsometrische Schichtdickenvergleich für eine Probenreihe, die mit CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln beschichtet wurde, ist in Abbildung 4.17 gezeigt.

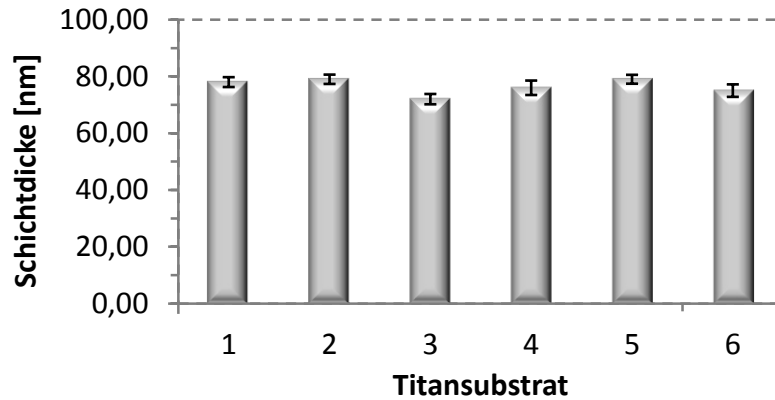


Abbildung 4.17: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken einer Titanprobenreihe nach dreiminütiger Sprühbeschichtung mit einer Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Die Schichtdicke der sechs Proben lag bei einer Sprühdauer von drei Minuten zwischen 72-79 nm mit einem maximalen Fehler von $\pm 2,5$ nm pro Plättchen. Wie bei CS(17)-TPP, siehe Kapitel 4.1.2, zeigen die Ergebnisse, dass sich die Sprühbeschichtung trotz manueller Durchführung gut zur Herstellung reproduzierbarer Beschichtungen aus CS(42)-TPP Nanopartikeln eignet. Die final resultierende Schichtdicke ist für CS(42)-TPP mit ca. 75 nm etwas niedriger als die für CS(17)-TPP erhaltene Schichtdicke von ca. 89 nm. Diese Unterschiede sind auf die eigenhändige Einstellung der Airbrush und Durchführung der Sprühbeschichtung zurückzuführen, sodass im Fall der CS(17)-TPP Beschichtungen wahrscheinlich der Volumenstrom etwas höher ausfiel und daraus dickere Schichten resultierten.

Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

Mittels XPS¹⁷ wurde in weiteren Untersuchungen die Zusammensetzung der hergestellten Nanopartikelbeschichtungen analysiert. In Abbildung 4.18 ist der Vergleich zwischen einem unbeschichteten und einem mit CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln beschichteten Titansubstrat dargestellt.

¹⁷ XPS Messungen wurden von Dr. Wibke Dempwolf in Zusammenarbeit mit Hermann Götz und Prof. Heinz Duschner vom Institut für Angewandte Struktur- und Mikroanalytik in Mainz durchgeführt.

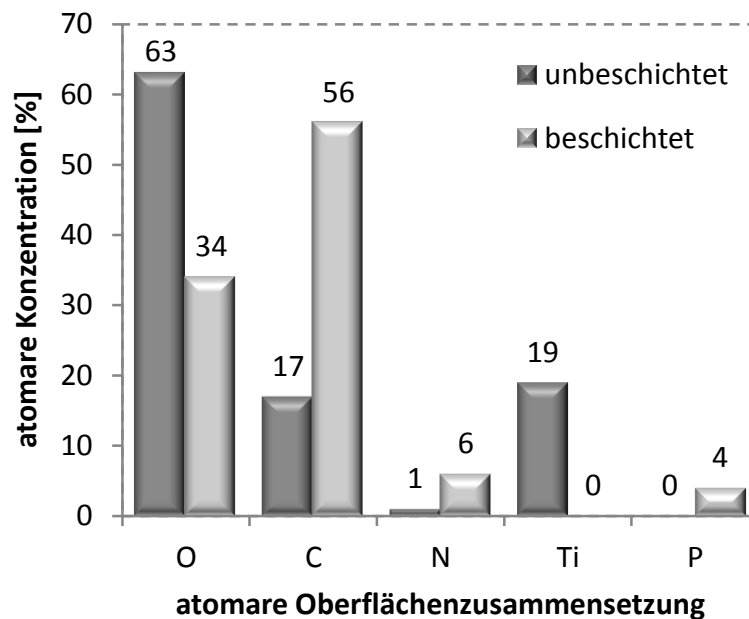


Abbildung 4.18: Bestimmung der atomaren Oberflächenzusammensetzung eines mit CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln beschichteten Titan-substrats mittels XPS im Vergleich zu einem unbeschichteten Titanplättchen.

Für das Kontrollplättchen konnten an der Oberfläche Sauerstoff (63 %), Kohlenstoff (17 %), Stickstoff (1 %) und Titan (19 %) detektiert werden. Sauerstoff und Titan können der passivierenden Titanoxidschicht zugeordnet werden, wohingegen es sich bei den Signalen für Kohlenstoff und Stickstoff um häufig auftretende Verunreinigungen (z.B. aus der Luft) handelt. Im Vergleich dazu konnten auf dem mit CS(42)-TPP Nanopartikeln beschichteten Substrat weniger Sauerstoff (34 %), mehr Kohlenstoff (56 %), mehr Stickstoff (6 %) und kein Titan, dafür aber Phosphor (4 %) nachgewiesen werden. Das Fehlen des Titansignals deutet darauf hin, dass sich auf der Oberfläche des Titanplättchens eine Schicht befindet, die dicker als die ca. 10 nm Eindringtiefe des XPS ist. Dies stimmt mit den zuvor gezeigten ellipsometrischen Daten überein. Der detektierte Phosphorpeak kann dem zur Partikelbildung verwendeten Tripolyphosphat zugeordnet werden. Die Zunahme des N- und C-Anteils dagegen ist auf das Kohlenstoffgerüst und die Aminogruppen des Chitosans zurückzuführen. Der hohe Sauerstoffanteil ist durch die Hydroxylgruppen des Polysaccharids und des Tripolyphosphats zu erklären. Die XPS-Daten bestätigen somit die Abscheidung der beiden Nanopartikelkomponenten an der Titanoberfläche.

Die für die Beschichtung gemessene Oberflächenzusammensetzung, siehe Abbildung 4.18, weicht jedoch etwas von der theoretisch berechneten Zusammensetzung der CS(42)-TPP (3:1) Nanopartikel ab. Die Berechnungen ergaben für Sauerstoff 42,1 %, für Kohlenstoff

47,5 %, für Stickstoff 7,0 % und für Phosphor 3,4 %. Die gemessenen Werte für Phosphor und Stickstoff der Beschichtung stimmen mit den erwarteten Werten gut überein. Die Abweichung für Kohlenstoff und Stickstoff könnte aus üblichen, kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen resultieren, die den Kohlenstoffanteil anheben und dadurch den detektierten Sauerstoffanteil senken.

Raster-Elektronen-Mikroskopie

Um aufzuklären, ob die Nanopartikel nach der Beschichtung intakt auf der Oberfläche der Titansubstrate vorliegen, wurden REM¹⁸ Aufnahmen der Beschichtungen aufgenommen. In Abbildung 4.19 ist eine 250-fache Vergrößerung eines Titansubstrats gezeigt, das mit einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension teilbeschichtet wurde. Der Übergang zwischen der beschichteten Seite des Titanplättchens (links) und der unbeschichteten Seite (rechts) ist in dem Bild deutlich zu erkennen.

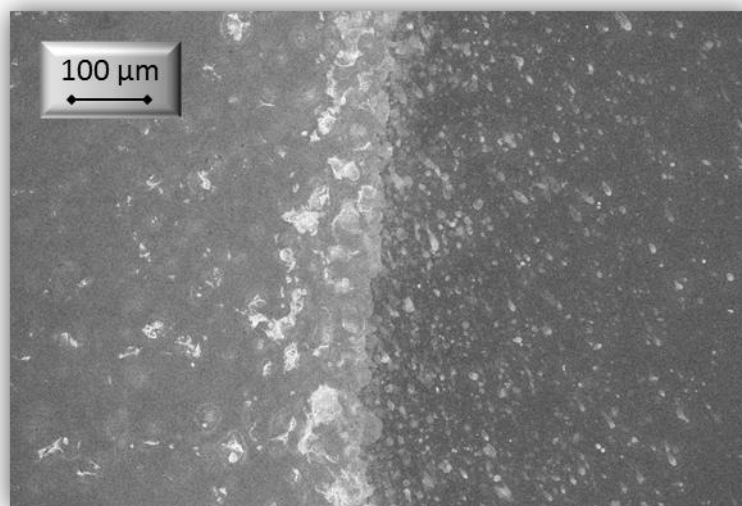


Abbildung 4.19: REM-Aufnahme des Übergangs einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelteilbeschichtung nach 1,5-minütiger Sprühbeschichtung eines Titansubstrats (250-fach vergrößert), beschichtet (links) und unbeschichtet (rechts).

In Abbildung 4.20 ist eine REM-Aufnahme einer beschichteten Probenhälfte (links) und der blanken Titanseite (rechts) in 250-facher Vergrößerung zu sehen. Den erhaltenen REM-Bildern zufolge bildet die Beschichtung mit einer CS(42)-TPP Nanopartikelsuspension einen relativ homogenen Film auf den untersuchten Titansubstraten aus.

¹⁸ REM Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Peter Pfeiffer am Institut für Werkstoffe der TU Braunschweig angefertigt.

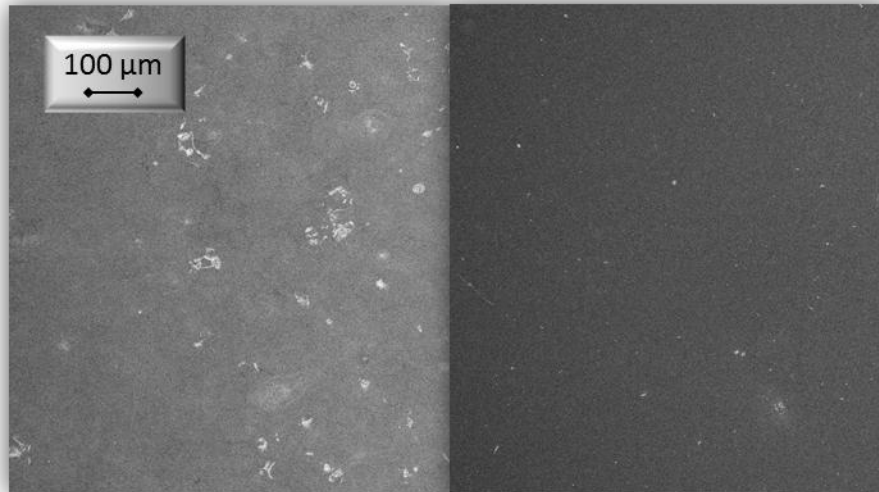


Abbildung 4.20: REM-Aufnahme der beschichteten Seite einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelteilbeschichtung nach 1,5-minütiger Sprühbeschichtung eines Titansubstrats (links) und der unbeschichteten Seite (rechts), je 250-fach vergrößert.

In Abbildung 4.21 ist eine 30.000-fache Vergrößerung der beschichteten Seite eines Titanplättchen gezeigt. Auf der Oberfläche sind keine Nanopartikel zu erkennen, obwohl diese bei der verwendeten Vergrößerung bereits sichtbar sein sollten. Auch für Vergrößerungen bis zu 200.000-fach konnten auf den beschichteten Substratseiten keine nanopartikelartigen Strukturen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass sich die CS(42)-TPP Nanopartikel während des Sprühprozesse an der Titanoberfläche zu einem Film umlagern. Da aufgrund des bereits angesprochenen, relativ niedrigen Zetapotentials der CS(42)-TPP Partikel keine hohe Stabilität der Partikel zu erwarten ist, stellt die Aggregation der Nanopartikel beim Aufprall auf die Titanoberfläche ein realistisches Szenario dar. Über dieses Verhalten könnte aus den auftreffenden Nanopartikeln ein homogener, ionisch vernetzter Film entstehen. Das Phänomen der Aggregation oder Koaleszenz von Feststoffen über eine physikalische Trocknung (Verdampfen des Lösungsmittels) wird auch für Beschichtungen mit wasserbasierten Lacken als Grundlage des filmbildenden Prozesses beschrieben und unterstützt die These der Filmbildung.^[119]

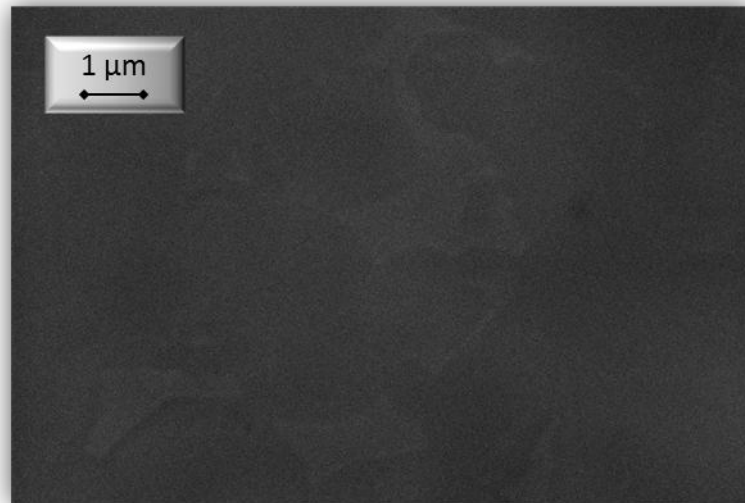


Abbildung 4.21: REM-Aufnahme der beschichteten Seite einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelteilbeschichtung nach 1,5-minütiger Sprühbeschichtung eines Titansubstrats (30000-fach vergrößert).

Zusammengefasst deuten die Daten der verschiedenen Analytikmethoden daraufhin, dass CS(42)-TPP Nanopartikel sich homogen und reproduzierbar auf Titansubstraten mittels Sprühbeschichtung ablagern lassen. Die Nanopartikel scheinen jedoch durch den Sprühprozess einen ionisch vernetzten Film aus Chitosan und Tripolyphosphat auf den Titanplättchen auszubilden.

Beschichtungsstabilität¹⁹

Wie für das CS(17)-TPP System wurde auch für die hergestellten CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelbeschichtungen die Beschichtungsstabilität bei Lagerung in verschiedenen Medien untersucht. Auch hier wurden die Plättchen für die ellipsometrischen Messungen aus dem jeweiligen Medium entnommen und getrocknet. Als Medium wurde für CS(42)-TPP neben Millipore Wasser und PBS auch noch fetales Kälberserum (FBS) getestet. Aufgrund der Degradabilität der CS(42)-TPP Nanopartikel wurden auch Versuchsreihen mit Millipore Wasser + Lysozym und PBS + Lysozym durchgeführt. In Abbildung 4.22 sind die Verläufe für die Schichtdickenabnahme von CS(42)-TPP beschichteten Titansubstraten für Millipore und Millipore + 1,5 µg/mL Lysozym gezeigt.

¹⁹ Trotz identischer Vorgehensweise wurden für einige Probenreihen im Vergleich zu den hier gezeigten Ergebnissen abweichende Resultate erhalten. Die Ursache hierfür konnte nicht aufgeklärt werden.

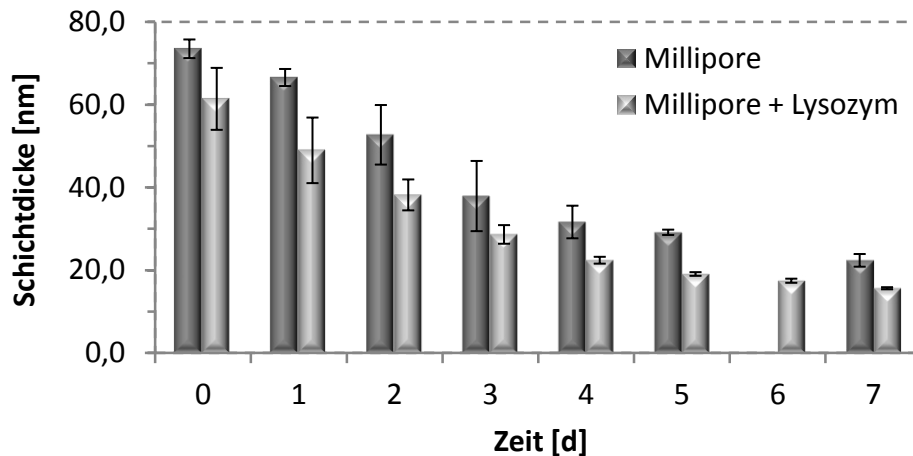


Abbildung 4.22: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten zur Aufzeichnung der Beschichtungsstabilität während der Inkubation in Millipore und Millipore mit 1,5 µg/mL Lysozym bei 37 °C; je 3 Titanplättchen jeweils 3 Minuten sprühbeschichtet. Messwert für Millipore nach 6 Tagen fehlt.

Es ist eine deutliche Abnahme der Schichtdicke mit voranschreitender Lagerungszeit in beiden Medien zu erkennen. Im Gegensatz zu den CS(17)-TPP Beschichtungen, siehe Kapitel 4.1.2, findet für die CS(42)-TPP Beschichtungen eine schnelle Ablösung der Filme statt. Die höhere Stabilität der CS(17)-TPP Beschichtungen könnte auf das höhere Zetapotential der CS(17)-TPP Partikel zurückzuführen sein (+46 mV im Vergleich zu +23 mV), da diese aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen besser an der Titanoberfläche adsorbieren. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden CS(42)-TPP (7:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel mit einem Zetapotential von +45 mV hergestellt und zum Beschichten verwendet. Da auch diese Beschichtungen eine geringe Stabilität in Wasser aufweisen und im Ablöseverhalten den CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Beschichtungen entsprechen, kann das Zetapotential als mögliche Ursache ausgeschlossen werden. Somit ist höchstwahrscheinlich der veränderte Acetylierungsgrad des Chitosans für die Stabilitätsunterschiede verantwortlich, da Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von 42 % wasserlöslich ist und nicht wie CS(17) nur im Sauren gelöst werden kann.

Die in Abbildung 4.22 beobachtete, gleichmäßige Schichtdickenabnahme unterstützt darüber hinaus die Annahme der homogenen Filmbildung aus den REM-Untersuchungen, da sich das Ablösenverhalten gut über das Ablösen der jeweils obersten Schicht eines Films erklären lässt. Ein Ablösen ganzer Nanopartikel scheint dagegen unwahrscheinlich. Dass für die CS(42)-TPP Beschichtungen kein Unterschied zwischen der Lagerung in Millipore und der

lysozymhaltigen Lösung beobachtet werden konnte, liegt vermutlich an dem ohnehin schnellen Ablösen der Beschichtung. Um zu prüfen, welchen Einfluss Lysozym auf die Beschichtungsdegradation hat, wurden weitere Versuchsreihen mit 150 µg/mL Lysozym anstatt 1,5 µg/mL durchgeführt. In Abbildung 4.23 ist die Schichtdickenabnahme für CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelbeschichtungen auf Titansubstraten in Millipore Wasser 150 µg/mL Lysozym dargestellt.

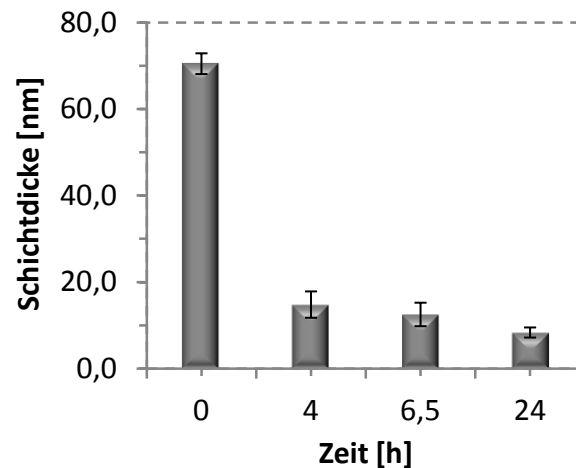


Abbildung 4.23: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten zur Aufzeichnung der Beschichtungsstabilität während der Inkubation in Millipore Wasser mit 150 µg/mL Lysozym; je 3 Titanplättchen jeweils 3 Minuten sprühbeschichtet.

Die erhöhte Lysozymkonzentration hat, wie im Vergleich zu Abbildung 4.22 klar zu sehen ist, einen deutlichen Effekt auf den Beschichtungsabbau und führt bereits nach vier Stunden zu einer annähernd vollständigen Zersetzung der Beschichtung. Die Stabilität der Beschichtungen wurde auch für andere Medien getestet, die einer *in vitro* Testung der Stabilität der Beschichtung näher kommen. Hierzu wurden PBS, PBS mit 1,5 µg/mL Lysozym und FBS eingesetzt. Die Ablöseverläufe in diesen Medien glichen dem in Abbildung 4.23 gezeigten Verlauf für Reinstwasser mit 150 µg/mL Lysozym. Der Einsatz von FBS simuliert hierbei bestmöglich die *in vivo* Situation und verdeutlicht, dass die Stabilität der CS(42)-TPP Beschichtungen in einem komplexen, biologischen Medium sehr gering ist. Die erhaltene geringe Stabilität der CS(42)-TPP Filme könnte jedoch für die geplante Anwendung als Beschichtung für den Schaft von Hüftimplantaten interessant sein, da so möglicherweise die dort notwendige schnelle Wirkstofffreisetzung gefördert wird.

4.2.3 In vitro Studien: BMP-2²⁰

Nachdem die Partikelbildung, Degradierbarkeit und Ausbildung von Beschichtungen auf Titan von CS(42)-TPP Nanopartikel untersucht wurde, wurden Wirkstofffreisetzungsstudien mit BMP-2 durchgeführt. Hierzu wurden CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel mit verschiedenen Mengen BMP-2 beladen. Anschließend wurde die eingelagerte und freigesetzte Menge an BMP-2 über einen ELISA quantifiziert.

Zu Beginn soll die Partikelbildung und die Veränderung von Partikeleigenschaften durch die Zugabe von BMP-2 dargestellt und diskutiert werden. Die Einlagerung des BMP-2 in CS(42)-TPP Nanopartikel erfolgte über das Einmischen des Proteins in die vorgelegte Chitosanlösung und anschließender ionischer Gelierung durch die Vernetzung mit Tripolyphosphat. Die so erhaltenen CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung hinsichtlich Größe und Zetapotential charakterisiert. In Abbildung 4.24 ist ein Vergleich der Größenverteilung von reinen CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln mit BMP-2 beladenen CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, 51,3 µg/mL BMP-2²¹) Nanopartikeln gezeigt.

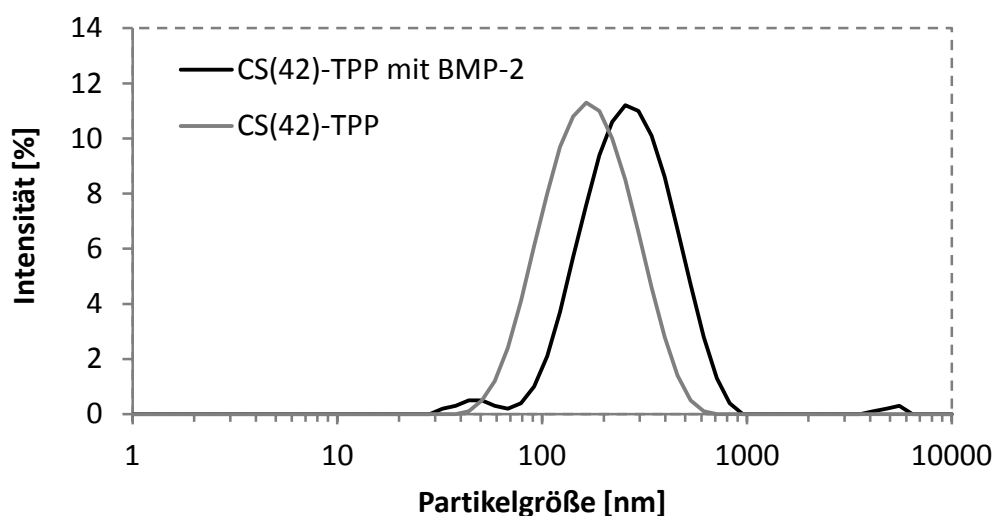


Abbildung 4.24: Partikelgrößenverteilungen von Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionen ohne Protein und mit 51,3 µg/mL BMP-2 beladen.

²⁰ Assays zur Proteinquantifizierung wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung im Arbeitskreis von Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross von Dr. Virginia Seiffart und Inge Hollatz-Rangosch durchgeführt.

²¹ Die jeweils angegebene BMP-2-Konzentration entspricht immer der BMP-2-Menge, die vor der Partikelbildung mit der Chitosanlösung vermischt wurde.

Der Vergleich zeigt, dass die Einlagerung von BMP-2 zur Bildung größerer Partikel führt. Während für die unbeladenen CS(42)-TPP Nanopartikel ein z-Average von ca. 148 nm (PDI 0,25) gemessen wurde, ergab sich für die BMP-2 beladenen Partikel ein z-Average von ca. 227 nm (PDI 0,25). Die Anwesenheit des kleinen Peaks vor dem Hauptpeak weist im Fall der CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikel auf eine weitere Partikelpopulation unterhalb von 100 nm hin, die aufgrund der geringen Streulichtintensität hier nur wenig zur Geltung kommt.

Auch der Vergleich des Zetapotentials BMP-2 beladener und unbeladener CS(42)-TPP Nanopartikel weist auf eine Integration des BMP-2 in die Nanopartikel hin. Von anfänglichen 23 mV für die unbeladenen CS(42)-TPP Nanopartikel führt die Einlagerung von BMP-2, wie in Abbildung 4.25 gezeigt, zu einer Erhöhung des Zetapotentials auf ca. 29 mV.

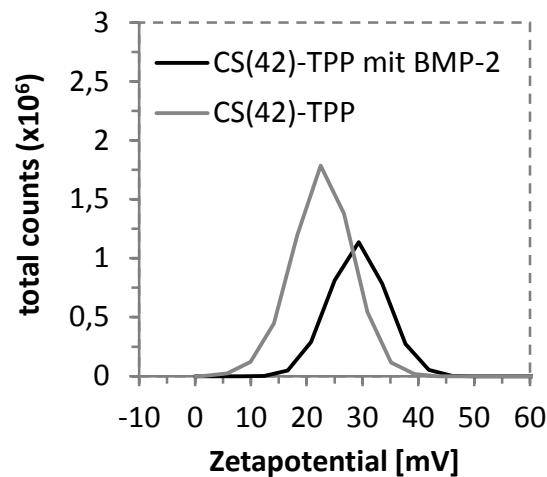


Abbildung 4.25: Zetapotential von Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionen ohne Protein und mit 51,3 µg/mL BMP-2 beladen.

Die Zunahme des Zetapotentials stimmt mit den Erwartungen überein, da BMP-2 in dem hier verwendeten pH-Bereich eine positive Nettoladung trägt. Somit ist nicht nur wegen der Einlagerung über die spontane Gelierung, sondern auch wegen der elektrostatischen Abstoßung zwischen den positiv geladenen Partikeln und dem Protein eine reine Adsorption des Proteins an der Partikeloberfläche unwahrscheinlich.

Um weitere Aussagen über eine mögliche Einlagerung des Proteins treffen zu können, wurde versucht die Einlagerungseffizienz von BMP-2 in CS(42)-TPP Nanopartikel und die Proteinfreisetzung aus den Nanopartikeln über einen ELISA zu quantifizieren. Wie von GAN et al. beschrieben und auch in Kapitel 4.1.3 für CS(17)-TPP-BMP-2 Nanopartikel durchgeführt, sollten die CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikel zur Quantifizierung der Proteinfreisetzung über Zentrifugation von der Mutterlösung getrennt werden.^[41] Dies war jedoch für die CS(42)-

TPP-BMP-2 Nanopartikel nicht möglich, da sich die Eigenschaften der Nanopartikel wahrscheinlich aufgrund des geänderten Acetylierungsgrads des Chitosans verändert haben. CS(42) zeigt im Vergleich zu CS(17) eine bessere Löslichkeit in wässrigen Medien, siehe auch Kapitel 3.2.1. Dies beeinflusst vermutlich auch das Lösungsverhalten der CS(42)-TPP Nanopartikeln und könnte die Probleme bei der Abtrennung der Partikel von der Lösung erklären. Untersuchungen, die daraufhin zur Zentrifugierbarkeit der CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel durchgeführt wurden, zeigten, dass die Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für eine Stunde zu keiner nennenswerten Sedimentation der Partikel führte. Mittels dynamischer Lichtstreuung wurde der Überstand der zentrifugierten Lösung analysiert. Die Partikelgrößenverteilungen vor und nach der Zentrifugation waren vergleichbar, bis auf die Tatsache, dass eine geringere Abschwächung des Streulichtes durch das Gerät vorgenommen wurde. Dies deutet darauf hin, dass sich weniger Partikel im Überstand befanden und die Probe aus diesem Grund streuärmer war. Somit scheint sich zwar ein Teil der Nanopartikel abzusetzen, ein Großteil der Partikel befindet sich aber immer noch in Lösung. Auch eine Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge bei bis zu 40000 rpm und 4 °C lieferte nach einer halben Stunde nur eine gelartige Ablagerung und kein richtiges Pellet. Die Quantifizierung der Proteinfreisetzung konnte folglich über diese Methode für das CS(42)-TPP System nicht realisiert werden, da durch den Verbleib von Nanopartikeln im Überstand die abgetrennte BMP-2 Menge und somit auch die BMP-2 Menge in den abzentrifugierten Partikeln unbekannt ist.

Als alternative Methode wurde die Quantifizierung der BMP-2 Freisetzung über die Degradation von BMP-2 beladenen Nanopartikelbeschichtungen auf Titansubstraten verfolgt. Vorteil dieser Methode ist, dass die proteinbeladenen Nanopartikel nicht von der Mutterlösung getrennt werden müssen, sondern direkt zur Sprühbeschichtung eingesetzt werden können. Darüber hinaus spiegelt diese Art der Freisetzungsuntersuchung die tatsächlich geplante Anwendung als Implantatbeschichtung besser wider als die Charakterisierung der Freisetzung aus einer Partikelsuspension.

Für die *in vitro* Freisetzung von BMP-2 aus Beschichtungen wurden BMP-2 beladene CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, pH 3,5 in AcOH) Nanopartikel, wie in diesem Kapitel bereits beschrieben, hergestellt. Die Einlagerungseffizienzen wurden mittels ELISA direkt aus der Mutterlösung ermittelt und lagen für die durchgeführten Versuchsreihen zu dieser Methode bei 88-97 %.

Die Bestimmung direkt aus der Mutterlösung wird hierbei über die feste Integration des Proteins in die Nanopartikel ermöglicht, wodurch es für den ELISA nicht zugänglich ist. Neben den proteinbeladenen Nanopartikeln wurden auch reine CS(42)-TPP Nanopartikel als Kontrolle hergestellt. Die Beschichtung der Titansubstrate erfolgte über Sprühbeschichtung unter Verwendung von je 200 μL Partikelsuspension pro Titanplättchen. Für die Freisetzungsstudien wurden die beschichteten Plättchen bei 37 °C in einem Milliliter Millipore Wasser oder Millipore Wasser mit 1,5 $\mu\text{g/mL}$ Lysozym geschwenkt. Die Quantifizierung der BMP-2 Freisetzung einer Versuchsreihe mit ca. 17 $\mu\text{g/mL}$ BMP-2 über einen ELISA ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

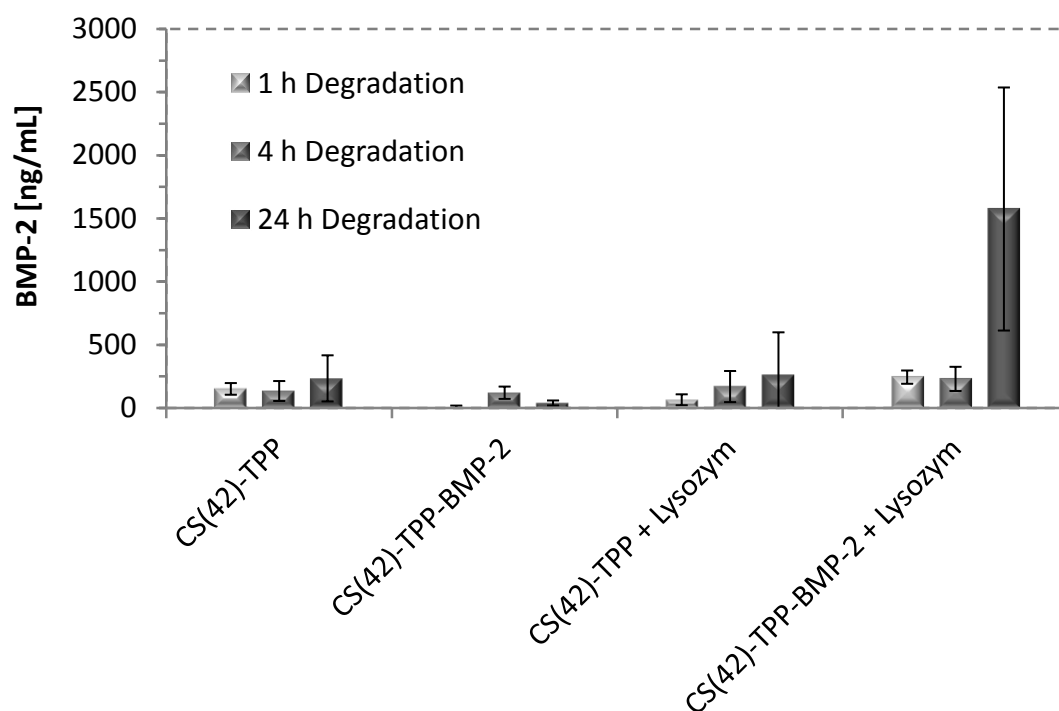


Abbildung 4.26: Quantifizierung der *in vitro* Freisetzung von BMP-2 aus Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten während der Lagerung in Millipore und Millipore + Lysozym bei 37 °C mittels ELISA (nicht reproduzierbar), jeweils 3 Plättchen pro Probenreihe.

Es ist zu erkennen, dass für die Kontrollproben aus reinem CS(42)-TPP bis zu 250 ng/mL freigesetztes BMP-2 ermittelt wurden. Dies ist nicht sinnvoll und auf eine nicht optimal geplante Standardreihe zurückzuführen, in der nur ein Wert unterhalb von 500 ng/mL erfasst wurde. Somit führt eine minimale Signalabweichung von Null direkt zu einem relativ hohen Wert. Alle Werte, bis auf die 24 Stunden Freisetzung aus BMP-2 beladenen Partikeln mit Lysozym, sollten deshalb als Hintergrund vernachlässigt werden. Für die BMP-2 Quantifizierung der

BMP-2 beladenen Beschichtungen mit lysozymhaltiger Lösung ergaben sich nach 24 Stunden ca. 1600 ng/mL BMP-2 mit einer großen Abweichung zwischen den einzelnen Titanplättchen (800-2600 ng/mL). Trotz der starken Schwankung deutet dies darauf hin, dass womöglich von den maximal verfügbaren 3400 ng BMP-2 in der Beschichtung bereits nach 24 Stunden circa die Hälfte freigesetzt wurde. Die maximal verfügbare BMP-2 Menge in einer Beschichtung ergibt sich hierbei über die Multiplikation der BMP-2 Konzentration der Partikelsuspension mit dem verwendeten Partikelsuspensionsvolumen ($17 \mu\text{g/mL} \times 0,2 \text{ mL}$). Weitere Freisetzungsstudien, die zur Reproduktion der Ergebnisse durchgeführt wurden, konnten die zuvor beobachtete sehr hohe BMP-2 Freisetzung von CS(42)-TPP Beschichtungen jedoch nicht bestätigen. Die Folgeversuche lieferten BMP-2 Freisetzungsmengen von 2 ng/mL, 8 ng/mL und 30 ng/mL. Somit scheint es sich bei der in Abbildung 4.26 gezeigten hohen Freisetzung von BMP-2 aus CS(42)-TPP Beschichtungen um ein Artefakt zu handeln.

Da über den ELISA bei gleicher Durchführung für jeden Versuch andere Ergebnisse erhalten wurden, wurde die Methode zur BMP-2 Quantifizierung gewechselt. Im Folgenden werden Ergebnisse vorgestellt, die über die Quantifizierung der BMP-2-Menge mittels eines BRE-Luciferase Test erhalten wurden. Diese Methode basiert auf dem Einsatz von genetisch modifizierten Zellen (BRE-Luc Zellen), die durch BMP-2 zur Bildung von Luciferase angeregt werden. Die exprimierte Luciferase kann über die Ausbildung eines Komplexes mit Luciferin optisch detektiert und mit der vorhandenen BMP-2 Menge über eine Standardreihe in Relation gesetzt werden. Das Modell der Freisetzung von BMP-2 aus CS(42)-TPP Nanopartikeln, die auf Titansubstrate aufgesprüht wurden, bleibt hierbei unverändert.

Wie zuvor für die ELISA-Freisetzungsuntersuchungen wurde das BMP-2 ($16 \mu\text{g/mL}$) vor der Partikelbildung mit der Chitosanlösung vermischt und anschließend mit Tripolyphosphat zu BMP-2 beladenen CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL , 0,075 % AcOH) Nanopartikeln vernetzt. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die Titansubstrate für je drei Minuten mit der CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikelsuspension mittels Sprühbeschichtung beschichtet. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 vorgestellt, liefert diese Methode sehr gut reproduzierbare Schichtdicken und demzufolge auch vergleichbare, abgelagerte Stoffmengen. Um die aufgesprühte Menge an BMP-2 bestimmen zu können, wurden Tests zum Volumenstrom während der Sprühbeschichtung durchgeführt. Diese Vorversuche ergaben, dass in drei Minuten etwa $20 \mu\text{L}$ auf die Titansubstrate gesprüht werden. Da ein Milliliter der CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikel-

suspension 16 µg BMP-2 enthält, wurden pro Plättchen (1 x 1 cm) ca. 320 ng/cm² BMP-2 aufgesprüht. Nach Anlagerung der BRE-Luc Zellen wurde die Freisetzung in 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 10 % FBS mit 1,5 µg/mL Lysozym durchgeführt. Nach 48 Stunden Lagerung in einem Inkubator bei hoher Luftfeuchtigkeit, um das Freisetzungsvolumen konstant zu halten, wurde die biologisch aktive Menge an BMP-2 über den BRE-Luc Test quantifiziert. Die Ergebnisse zur Quantifizierung der biologisch aktiven BMP-2-Menge sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

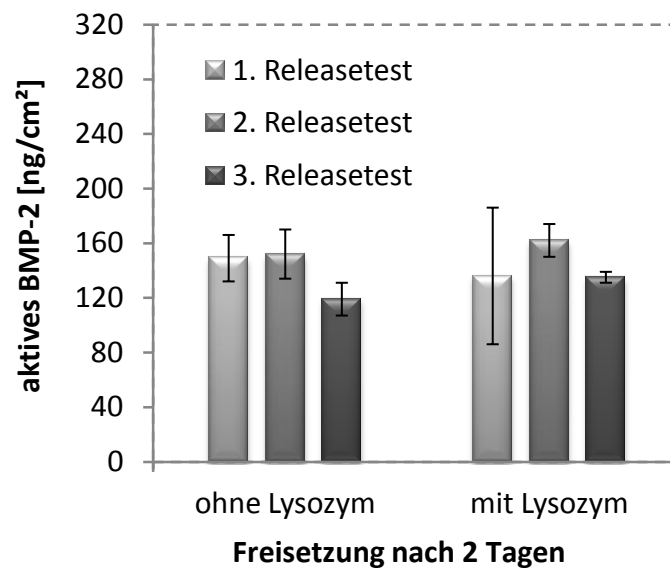


Abbildung 4.27: Quantifizierung der in vitro Freisetzung von BMP-2 aus Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten während der Lagerung in fetalem Kälberserum (FBS) und FBS + Lysozym bei 37 °C mittels BRE-Luciferase Test, jeweils 3 Plättchen pro Probenreihe.

Wie in den drei durchgeführten Freisetzungsstudien gezeigt werden konnte, sind die erhaltenen Ergebnisse sehr gut reproduzierbar. Die Quantifizierung über den BRE-Luc Test ergab im Durchschnitt ungefähr 142 ng/cm² biologisch aktives BMP-2 pro Titanplättchen. Dies entspricht ca. 45 % der aufgesprühten 320 ng BMP-2, das als biologisch aktiv an der Oberfläche der Titansubstrate oder in Lösung im Überstand nachgewiesen werden konnten. Für die jeweiligen Kontrollbeschichtungen aus CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln konnte in den Versuchsreihen kein BMP-2 nachgewiesen werden. Des Weiteren ist in Abbildung 4.27 zu sehen, dass zwischen den beiden Freisetzungsmedien (FBS und FBS + Lysozym) kein Unterschied festgestellt werden konnte. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich

bei Lysozym um ein im Serum vorkommendes Protein²² handelt.^[53,54,111] Somit wird angenommen, dass durch die Zugabe von 1,5 µg Lysozym die Enzymkonzentration lediglich etwas erhöht wurde.

Ein Vergleich der erhaltenen Daten der BRE-Luc-Test Ergebnisse aus Abbildung 4.27 und der in Abbildung 4.26 gezeigten BMP-2 Quantifizierung via ELISA deutet darüber hinaus an, dass die hohe detektierte BMP-2 Menge im ELISA möglicherweise doch kein Artefakt ist. Für die Studien des BRE-Luc Tests wurde ein ungefähreres Sprühvolumen von 20 µL (16 µg/mL BMP-2) verwendet und daraufhin ca. 142 ng biologisch aktives BMP-2 an der Oberfläche nachgewiesen. Die zuvor beschriebenen Beschichtungen für die ELISA Quantifizierung wurden aus 200 µL Nanopartikelsuspension (17 µg/mL BMP-2) hergestellt und sollten dementsprechend mehr als zehnmal so viel BMP-2 beinhalten. Aus diesem Grund erscheint die quantifizierte BMP-2 Menge von ca. 1600 ng nach einem Vergleich mit den BRE-Luc Daten realistisch, zumal theoretisch insgesamt ca. 3400 ng BMP-2 über die Nanopartikel aufgetragen wurden.

Alles in Allem zeigen die *in vitro* Studien, dass die CS(42)-TPP Nanopartikel ein geeignetes System darstellen, um BMP-2 sehr effizient einzulagern (88-97 %). Des Weiteren konnte über die Quantifizierung von BMP-2 auf CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Titansubstraten mittels BRE-Luc Test demonstriert werden, dass sich das System zur Präsentation von biologisch aktivem BMP-2 an Titanoberflächen eignet. Für Beschichtungen mit ca. 320 ng/cm² BMP-2 konnte in den Versuchsreihen durchschnittlich 142 ng/cm² biologisch aktives BMP-2 nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten in denen 4-9 ng/cm² biologisch aktives BMP-2^[10] (von 110 ng/cm² angebundenem BMP-2) zur Verfügung gestellt werden konnten, sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine deutliche Steigerung. Darüber hinaus ist die in dieser Arbeit gewählte eingelagerte BMP-2-Menge (16 µg/mL) aufgrund der hohen Kosten des Proteins sehr niedrig und würde vermutlich bei einer Erhöhung zu einer weiteren Steigerung der an der Titanoberfläche immobilisierten BMP-2-Menge führen. Dies wäre *in vitro* Ergebnissen von ABARRATEGI et al. zufolge auch wünschenswert, da dort eine maximale alkaline Phosphatase Aktivität (ALP, osteogener Marker im Mineralisationsprozess) für eine BMP-2 Konzentration von 100 nM (ca. 2,6 µg/mL) beschrieben wird.^[120] Diese Konzentration ist fast 20-mal höher als die hier *in*

²² Die konkrete Lysozymkonzentration in FBS konnte trotz ausführlicher Recherche und Erkundigungen nicht ermittelt werden.

vitro nachgewiesen BMP-2-Menge von 142 ng/cm² unter der Annahme, dass die Freisetzung in einen Milliliter erfolgt. Hierzu muss jedoch gesagt werden, dass bereits für ca. 390 ng/mL 50 % der maximalen ALP Aktivität erreicht werden.^[120] Dies verdeutlicht, dass für den Erhalt aussagekräftiger *in vivo* Studien die hier *in vitro* verwendete BMP-2-Menge deutlich gesteigert werden sollte.

4.2.4 *In vivo* Studie: Maus²³

Aufgrund der positiven Ergebnisse aus den *in vitro* Studien, wurde das CS(42)-TPP Nanopartikelsystem auch für *in vivo* Studien eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die BMP-2 beladen CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel *in vivo* ektopisches Knochenwachstum induzieren können, wurden Kleinterversuche mit Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden 3x3x3 mm große Kollagenschwämme mit CS(42)-TPP Nanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an BMP-2 beladen und in die caudalen Oberschenkelmuskeln von drei Mäusen implantiert, siehe Abbildung 4.28. Pro Kollagenschwamm wurden Nanopartikel mit einem BMP-2 Gehalt von 1 µg, 2 µg oder 5 µg eingebracht, jeweils zwei pro Maus. Als Kontrollen wurden in eine Maus zwei Kollagenschwämme mit unbeladenen CS(42)-TPP Nanopartikeln und in eine weitere Maus zwei Kollagenschwämme mit reinem BMP-2 implantiert. Nach vier Wochen Standzeit erfolgte die Explantation der gebildeten Knochenfragmente (Ossikel). Ein Ossikel, der für CS(42)-TPP mit 5 µg BMP-2 erhalten wurde, ist in Abbildung 4.29 dargestellt.



Abbildung 4.28: Implantationsstellen im unteren Rücken einer Maus.

²³ Tierversuche im Mausmodell wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross durchgeführt.

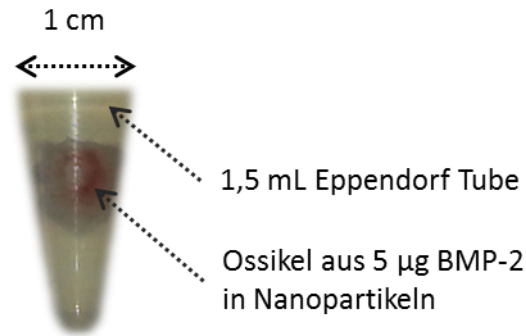


Abbildung 4.29: Aus einer Maus explantierter Ossikel nach vier Wochen Standzeit mit einem implantiertem Kollagenschwamm, der mit Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln (mit 5 µg BMP-2) versetzt war.

Die explantierten Ossikel wurden zur Auswertung der *in vivo* Studie histologisch²⁴ untersucht. Die Ergebnisse der Histologie sind in Abbildung 4.30 zu sehen und zeigen, dass mit steigender eingelagerter BMP-2-Menge in den Nanopartikeln (1 µg, 2 µg und 5 µg) auch die Größe der gebildeten Ossikel zunimmt.

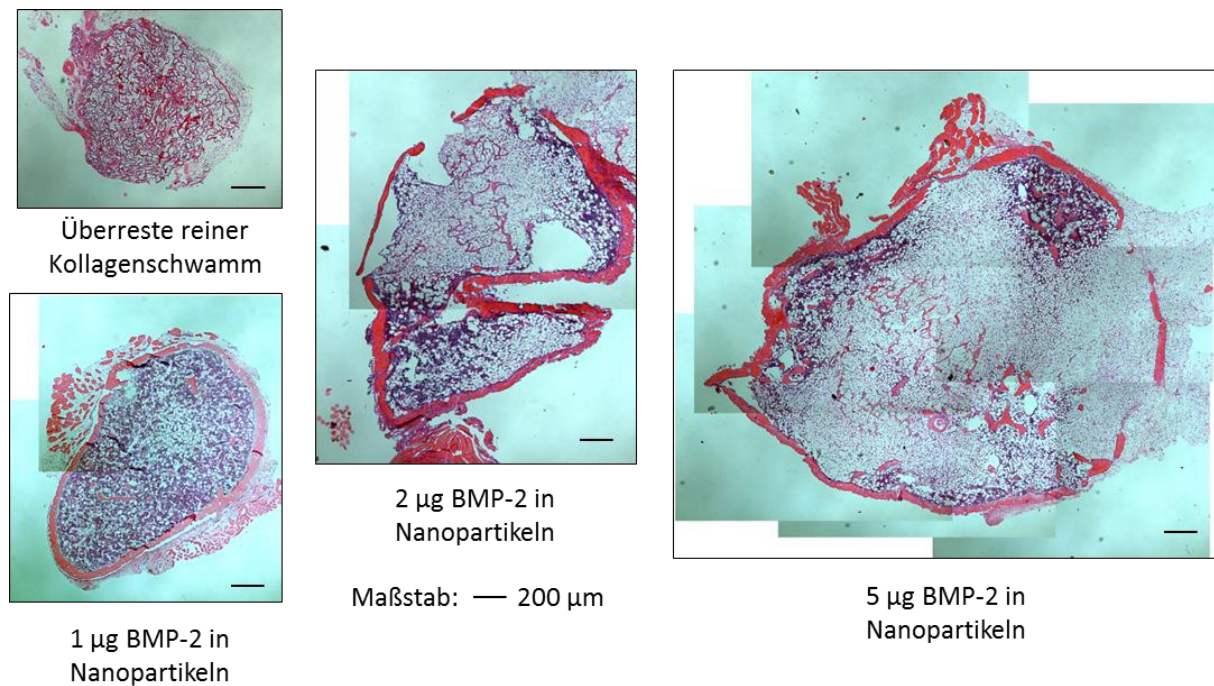


Abbildung 4.30: Darstellung der histologischen Untersuchung explantierter Ossikel aus Mäusen nach vier Wochen Standzeit mit implantierten Kollagenschwämmen, die mit Chitosan-Tripolyphosphat (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln (mit 1 µg, 2 µg oder 5 µg BMP-2) versetzt waren.

²⁴ Histologie: Gewebeproben werden in mikrometerdünne Scheiben geschnitten, angefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Unter Berücksichtigung des in Abbildung 4.30 angegebenen Maßstabs, lässt sich die tatsächliche Größe des in Abbildung 4.29 dargestellten Ossikels abschätzen und ergibt ohne Weichgewebe ca. 0,3 Zentimeter. Über die histologischen Schnittbilder konnte darüber hinaus für die BMP-2 haltigen Proben ein voll entwickelter Knochen mit kortikalem Knochen²⁵, trabekulärem Knochen²⁶ und Knochenmark nachgewiesen werden. Auch für die Kollagenschwämme, die nur mit BMP-2 beladen wurden, konnte ein Ossikel erhalten werden. Dieser wurde jedoch leider im Prozess des Zuschneidens zerstört, lag jedoch größtmäßig im Bereich des in Abbildung 4.29 gezeigten Ossikels. Für die mit CS(42)-TPP Kontrollpartikeln beladenen Kollagenschwämme wurde keine Knochenbildung beobachtet. Die in Abbildung 4.30 dargestellten histologischen Untersuchungen verdeutlichen somit, dass über die Implantation der CS(42)-TPP-BMP-2 beladenen Kollagenschwämme eine dosisabhängige, ektopische Knochenbildung in den Versuchstieren induziert werden konnte.

4.2.5 *In vivo* Studie: Kaninchen²⁷

Die *in vivo* Testung von CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Titanproben wurde im Kaninchenmodell durchgeführt. Hierfür wurden 3x3 mm große, hohle Titanzylinder über die in Abbildung 4.31 schematisch dargestellte Sprühhvorrichtung²⁸ mit CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln beladen mit 32 µg/mL BMP-2 beschichtet.

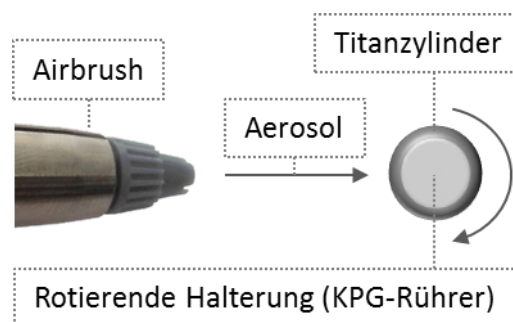


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung einer Beschichtungsvorrichtung zur Beschichtung von Titanzylindern für einen Tierversuch.

²⁵ Knochengewebe mit hoher Dichte, umgibt den trabekulären Knochen („Knochenhülle“)

²⁶ Knochengewebe mit niedriger Dichte und spongiöser Struktur

²⁷ Tierversuche im Kaninchenmodell wurden an der medizinischen Hochschule Hannover in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Henning Windhagen durchgeführt.

²⁸ Die Sprühhvorrichtung wurde von Rolf Harrendorf aus der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie der TU Braunschweig angefertigt und ist im Original in Kapitel 8.6.15 abgebildet.

Die Titanzylinder wurden für eine gleichmäßige Beschichtung mit einem KPG-Rührer gedreht und ein konstanter Volumenstrom wurde über die Fixierung von Flüssigkeits- und Gasstromregler an der Airbrush realisiert. In Vorversuchen wurde für einen Luftdruck von 1,5 bar ein Volumenstrom von etwa 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ ermittelt. Die Proben für die *in vivo* Testung wurden für je zehn Minuten mit der CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikelsuspension beschichtet. Somit wurden 20 μL pro Zylinder verwendet, was unter der theoretischen Annahme einer verlustfreien Beschichtung in ca. 640 ng BMP-2 pro Zylinder resultiert und über Einbezug der Mantelfläche der Zylinder ($0,283 \text{ cm}^2$) ungefähr $2,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ liefert. Als Kontrollen wurden reine Titanzylinder und mit CS(42)-TPP Kontrollpartikeln beschichtete Titanzylinder eingesetzt. Die Implantation erfolgte, wie in Abbildung 4.32 gezeigt, in die Femurkondylen²⁹ der Kaninchen.



Abbildung 4.32: Implantation eines Titanzylinders in den Oberschenkelknochen eines Kaninchens.

Nach einer Standzeit von vier Wochen wurden die Oberschenkelknochen explantiert und $\mu\text{-CT}$ ³⁰ Aufnahmen der Implantate in Knochen angefertigt. Im Anschluss wurden die Knochen mitsamt den Implantaten für die histologischen Untersuchungen geschnitten. In Abbildung 4.33 sind Ausschnitte der bildgebenden Verfahren, $\mu\text{-CT}$ und Histologie, dargestellt.

²⁹ Teil des knieseitigen Kopfes des Oberschenkelknochens.

³⁰ Mikrocomputertomographie

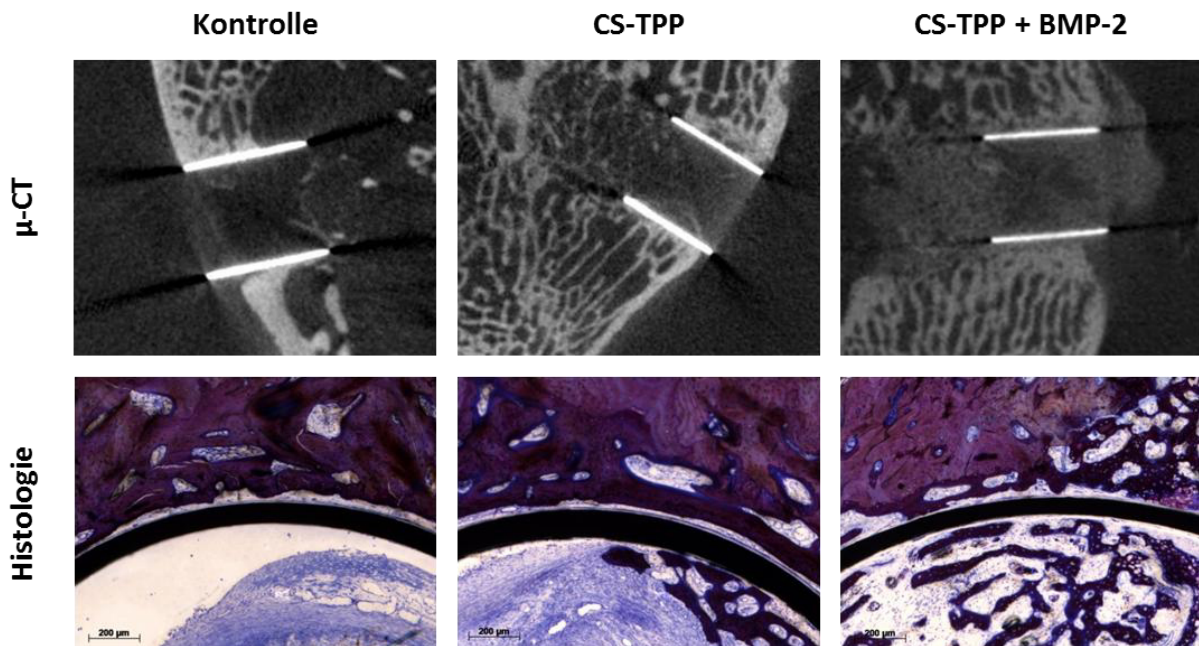


Abbildung 4.33: µ-CT und Histologie in die Oberschenkel von Kaninchen implantierter Titanzylinder nach einer Standzeit von vier Wochen. Vergleich zwischen unbeschichteten, Chitosan-Tripolyphosphat beschichteten und Chitosan-Tripolyphosphat + BMP-2 beschichteten Titanzylindern.

Für die µ-CT Untersuchungen ist an den Titanzylindern (weiße Balken) unabhängig von der Beschichtung ein enger Knochenkontakt zu erkennen, der für eine gute Osseointegration der Implantate spricht. Für die mit CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikeln beschichtete Probe ist angrenzend an das Implantat ein dickerer Knochen und darüber hinaus eine Kallusbildung um das Implantat herum zu beobachten. Des Weiteren scheint sich sogar Knochen innerhalb des Titanzylinders gebildet zu haben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das BMP-2 in aktiver Form implantiert werden konnte und im Kaninchen die Bildung von neuem Knochengewebe stimuliert. In den Aufnahmen aus der Histologie (Tolluidinblau-Färbung³¹) konnten die im µ-CT beobachteten Unterschiede ebenfalls festgestellt werden. Für die mit CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikeln beschichteten Titanzylinder zeigt sich auch hier eine deutliche Knochenneubildung innerhalb des Implantats, die wahrscheinlich durch Freisetzung von BMP-2 hervorgerufen wurde. Darüber hinaus ist für alle Proben eine dünne Bindegewebsschicht um die Implantate und stellenweise auch direkter Implantat-Knochen-Kontakt zu erkennen. Neben den erhaltenen Hinweisen auf die BMP-2 induzierte Knochenneubildung kann aufgrund der guten Osseointegration aller Implantate geschlossen werden, dass

³¹ Mineralisierter Knochen ≡ rotviolett, nicht kalzifizierter Knochen ≡ dunkelblau und Bindegewebe ≡ hellblau.

die Beschichtung der Implantate mit CS(42)-TPP Nanopartikeln keinen negativen Einfluss auf die Integration der Implantate in den Knochen hat.

Da in diesem *in vivo* Modell ein „press-fit“-Verfahren (kein Spalt zwischen Implantat und Knochen) zur Implantation eingesetzt wurde, konnte neben der Kallusbildung kein Unterschied in Bezug auf die Osseointegration zwischen den implantierten Titanzylindern beobachtet werden. Ein geeigneteres Tiermodell für den geplanten Einsatz des Beschichtungssystems in der Revisionsendoprotektik wäre ein Defektmodell, das einen Spalt zwischen Knochen und Implantat vorsieht. Dies könnte möglicherweise eine verbesserte Einsicht in induzierte Knochenbildungsprozesse im anvisierten Knochen-Implantat-Zwischenraum geben und exaktere Aussagen über Unterschiede im Osseointegrationsverhalten zwischen unbeschichteten und beschichteten Testkörpern ermöglichen. Aufgrund des hohen Zeitaufwands der *in vivo* Studie war eine weitere Durchführung im Zeitraum dieser Arbeit leider nicht möglich.

4.2.6 Überblick: Chitosan (42) - Tripolyphosphat Nanopartikel

CS(42)-TPP Nanopartikel konnten für ein CS-TPP Mischungsverhältnisse von 3:1 als positiv geladene Nanopartikel mit einem Zetapotential von +23 mV und einer engen Partikelverteilung (PDI 0,25; z-Average 146 ± 73 nm) erhalten werden. Über die Zugabe physiologischer Mengen an Lysozym (1,5 µg/mL) zu der Partikelsuspension konnte darüber hinaus mittels dynamischer Lichtstreuung die Biodegradierbarkeit der Nanopartikel bestätigt werden. Innerhalb von vier Tagen wurde hier eine Partikelgrößenreduktion von ca. 40 % beobachtet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Degradationsrate von der Lysozymkonzentration abhängt.

Für das CS(42)-TPP Nanopartikelsystem konnten mittels dreiminütiger Sprühbeschichtung homogene und reproduzierbare Beschichtungen mit Schichtdicken von ca. 75 nm auf Titanoberflächen hergestellt werden. Über XPS Messungen konnte die Anwesenheit der Nanopartikelbestandteile auf der Titanoberfläche nachgewiesen und eine vollständige Bedeckung der Titansubstrate beobachtet werden. Die an den Beschichtungen durchgeführten REM Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass sich die CS(42)-TPP Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Stabilität während des Beschichtungsprozesses über Aggregation in einen ionisch vernetzten Film auf den Titansubstraten umlagern. Die Stabilität dieser ionisch vernetzten Beschichtungen ist in den in dieser Arbeit getesteten Medien gering und nimmt in der nachfolgend gezeigten Reihenfolge ab: Millipore Wasser > PBS > FBS.

In Experimenten mit BMP-2 konnte über einen ELISA eine BMP-2-Einlagerungseffizienz von 88-97 % für das CS(42)-TPP Nanopartikelsystem ermittelt werden. Die biologische Aktivität des eingelagerten BMP-2 wurde in *in vitro* Studien mittels eines BRE-Luciferase Tests ermittelt und ergab für CS(42)-TPP-BMP-2 beschichtete Titansubstrate ca. 142 ng/cm² biologisch aktives BMP-2. Dies entspricht in etwa 45 % der aufgespritzten BMP-2 Menge. Zusätzlich konnte in einem *in vivo* Versuch in Mäusen eine dosisabhängige, ektopische Knochenbildung durch das CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikelsystem induziert werden. Eine weiterführende *in vivo* Studie zeigte für CS(42)-TPP-BMP-2 beschichtete Titanzylinder und die Kontrollproben eine gute Osseointegration in einem Kaninchenmodell. In dieser Studie konnte kein negativer Einfluss der Beschichtung auf die Osseointegration *in vivo* beobachten werden. Darüber hinaus wurden für die CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Titanzylinder im Vergleich zu den Kontrollproben eine Kallusbildung und die Bildung neuen Knochengewebes innerhalb der Zylinder festgestellt. Dies weist darauf hin, dass das BMP-2 in aktiver Form implantiert werden konnte und *in vivo* im Kaninchen Knochenwachstum induziert.

4.2.7 Ausblick

Um die Eignung des CS(42)-TPP-BMP-2 Systems für die Beschichtung von Revisionsendoprothesen weiter zu untersuchen, ist die Durchführung einer *in vivo* Versuchsreihe, die nicht mit dem „press-fit“-Verfahren arbeitet, sondern ein Defektmodell (Spalt zwischen Knochen und Implantat) verwendet, erstrebenswert. Dies könnte möglicherweise eine verbesserte Einsicht in induzierte Knochenbildungsprozesse im anvisierten Knochen-Implantat-Zwischenraum geben und exaktere Aussagen über Unterschiede im Osseointegrationsverhalten zwischen unbeschichteten und beschichteten Testkörpern ermöglichen.

In Bezug auf die viskosimetrischen Messungen stellt die Ermittlung der Diaden und Triaden Frequenzen in den verwendeten Chitosanen CS(17) und CS(42) mittels Hochfeld ¹H-NMR und ¹³C-NMR einen wichtigen Ansatz da, um eine Erklärung für den beobachteten Abbau des CS(17) zu finden.

Im nachfolgenden Kapitel werden zwei bereits während dieser Arbeit angestrebte Weiterentwicklungen zur Steigerung der Funktionalität und Stabilität des CS(42)-TPP Systems vorgestellt.

5 Weiterentwicklung des CS(42)-TPP Systems

5.1 Phosphoryliertes Chitosan³²

Aufgrund der in Kapitel 4.2.2 angesprochenen geringen Beschichtungsstabilität des CS(42)-TPP Systems wurde in weiterführenden Experimenten geprüft, ob sich die Stabilität der Beschichtungen über eine gezielte Modifikation des Chitosan erhöhen lässt. Dies wurde getestet, da ein zu schnelles Ablösen der Beschichtung möglicherweise kontraproduktiv ist und zum Abtransport von Teilen der Beschichtung und dementsprechend auch von Wirkstoff vom vorgesehenen Zielort führen könnte. Als Ansatz zur Modifikation des Chitosan wurde die Phosphorylierung gewählt, da Phosphonatgruppen, wie bereits von LORENZ et al.^[10] und ADDEN et al.^[9] gezeigt werden konnte, eine kovalente Bindung mit der Titanoberfläche eingehen können. Darüber hinaus wurde versucht das CS(42)-TPP-BMP-2 System über diese Modifikation weiter zu vereinfachen. Durch die Phosphatgruppen lässt sich Chitosan in ein Polyanion umwandeln, was wiederum die Nanopartikelbildung mit dem positiv geladenen BMP-2 (IEP 8,5) über ionische Wechselwirkungen ohne Tripolyphosphat als Vernetzungsreagenz ermöglichen könnte.

5.1.1 Synthesen

Eine Übersicht über eingesetzte Synthesewege zur Herstellung von phosphoryliertem Chitosan wird in einem Review von JAYAKUMAR et al. gegeben.^[121] Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Herstellung von phosphoryliertem Chitosan aus unterschiedlichen Chitosanen nach AMARAL et al.^[122], NISHI et al.^[123], CÁRDENAS et al.^[124] und PRAMANIK et al.^[125] durchgeführt. Hauptsächlich wurde ein Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von 42 %³³ verwendet. Die Charakterisierung der Produkte wurde über ¹H-NMR, ³¹P-NMR und Elementaranalyse durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse zu den einzelnen Synthesewegen werden im Folgenden vorgestellt.

³² Teile der Arbeiten wurden von den Forschungspraktikanten Maria Spät und Alex Groschopp durchgeführt.

³³ Hergestellt von Alex Groschopp während eines Forschungspraktikums.

Phosphorylierung nach PRAMANIK et al.

Nach PRAMANIK et al. soll die Phosphorylierung von Chitosan, wie in Abbildung 5.1 gezeigt, in essigsaurer Lösung mit Phosphorsäure über Refluxieren des Reaktionsgemisches erreicht werden.^[125] Da ein Ausfällen des erhaltenen Produktes in Methanol, wie in der Literatur beschrieben^[125], nicht möglich war, wurde Aceton als alternatives Fällungsmedium verwendet. Im ^1H -NMR wurde ein für Chitosan übliches Spektrum erhalten und es konnten keine Verunreinigungen festgestellt werden. Das ^{31}P -NMR wies einen Peak auf, der auf eine erfolgreiche Modifikation des Chitosans mit Phosphatgruppen hindeutete. Auch die Elementaranalyse ergab nach Berechnungen für verschiedene Ansätze Substitutionsgrade von 0,5-0,75 bezogen auf die Monomereinheiten des Polysaccharids.

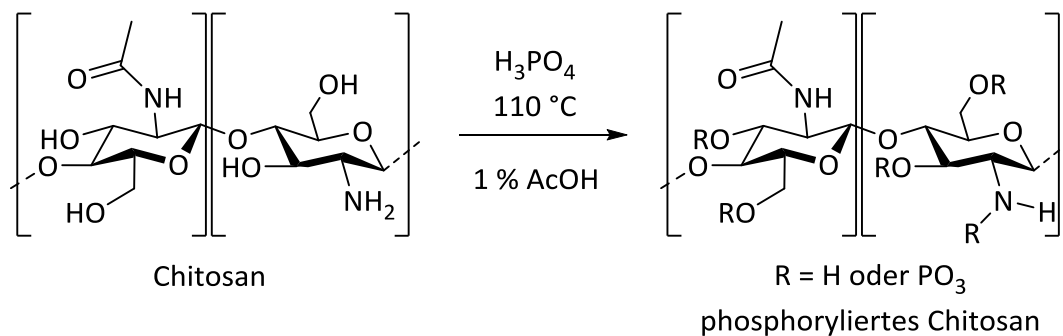


Abbildung 5.1: Phosphorylierung von Chitosan nach PRAMANIK et al..^[125]

Auch nach Dialyse des wasserlöslichen Produktes gegen destilliertes Wasser blieben die analytischen Resultate bestehen. Um auszuschließen, dass es sich um ein Salz handelt, in dem Phosphationen ionisch koordiniert an den protonierten Aminogruppen vorliegen, wurde die Dialyse nochmal unter Zugabe von Natriumchlorid durchgeführt. Nach der Dialyse gegen die Natriumchloridlösung verschwand das Signal aus dem ^{31}P -NMR, da die Phosphationen offensichtlich durch die hohe Konzentration an Chloridionen verdrängt wurden. Dies spricht dafür, dass sich nach der von PRAMANIK et al. veröffentlichten Methode wahrscheinlich ein Chitosan-Phosphat Salz gebildet hat und kein kovalent phosphoryliertes Chitosan.

Phosphorylierung nach NISHI et al.

Von NISHI et al. stammt eine der ersten Methoden zur Phosphorylierung von Chitin und Chitosan.^[123] Die Reaktion läuft, wie in Abbildung 5.2 dargestellt, in Methansulfonsäure unter Zugabe von Phosphorpentoxid ab. Entgegen der Literaturvorschrift wurde die Reaktion nicht bei 0 °C durchgeführt, da die Methansulfonsäure unterhalb von 17-19 °C gefriert.^[126]

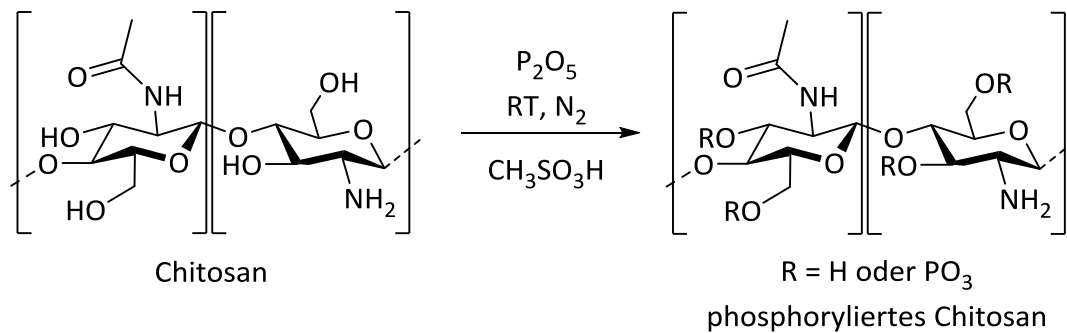


Abbildung 5.2: Phosphorylierung von Chitosan nach NISHI et al..^[123]

Methansulfonsäure ist in der Lage Chitosan zu lösen und fungiert gleichzeitig als Schutzgruppe für die Aminogruppen des Chitosans. Somit ist keine Phosphorylierung der Aminogruppen zu erwarten. Das erhaltene Produkt wurde zur vollständigen Aufreinigung nicht nur, wie in der Literatur beschrieben, ausgefällt und gewaschen, sondern auch über Dialyse mit Natriumchloridlösung gereinigt. Hierbei konnte während der Dialyse ein hoher Verlust an Polymer beobachtet werden, was auf die Diffusion des Produktes durch die Dialysemembran zurückzuführen ist. Dies war nicht zu erwarten, da das Chitosan mit einem Molekulargewicht von 190-310 kDa für die Poren der Dialysemembran mit einer Durchlässigkeit von bis zu 12 kDa normalerweise viel zu groß ist. Wie sich herausstellte, ist Chitosan in Methansulfonsäure nicht stabil und wird sehr schnell abgebaut. Aus diesem Grund konnten über diese Methode nur sehr geringe Ausbeuten von bis zu 16 % erhalten werden. Somit wurde die Phosphorylierung von Chitosan nach NISHI et al. verworfen, da es nicht wünschenswert ist, dass eine drastische Verringerung des Molekulargewichts des Chitosans während der Reaktion eintritt.

Phosphorylierung nach AMARAL et al.

Bei der Phosphorylierung von Chitosan nach der Methode von AMARAL et al. handelt es sich um eine heterogene Reaktion, die zur Oberflächenmodifikation von Chitosanmembranen eingesetzt wurde.^[122] Die Reaktion ist in Abbildung 5.3 dargestellt und erfordert die Umsetzung von Chitosan mit einem Gemisch aus Phosphorpentoxid, Triethylphosphat und Phosphorsäure in 2-Butanol.

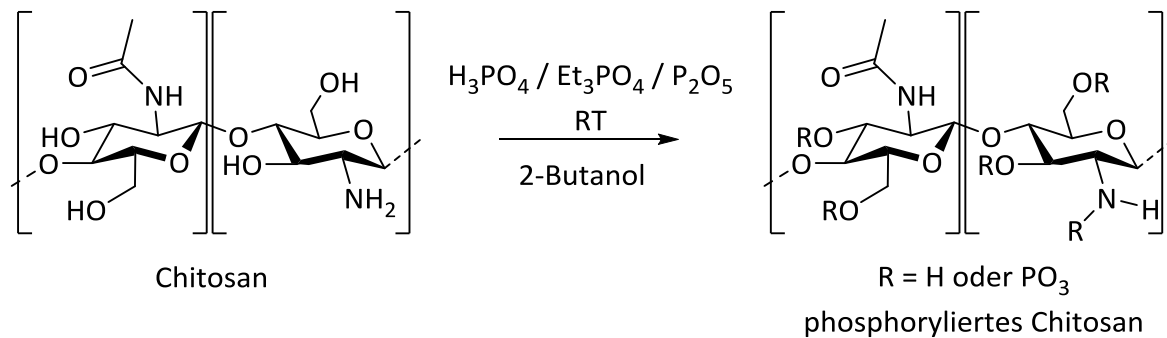


Abbildung 5.3: Phosphorylierung von Chitosan nach AMARAL et al..^[122]

Für unbehandeltes Chitosanpulver ließ sich die Methode, wie von AMARAL et al. beschrieben, ausführen. Nach 72 Stunden Reaktionsdauer konnten für die Reaktionsprodukte mittels Elementaranalyse Substitutionsgrade von bis zu 2,4 ermittelt werden. Eine Charakterisierung der Produkte via NMR war nicht möglich, da die Polymere sich nicht mehr lösen ließen und somit für die geplante Nanopartikelbildung unbrauchbar sind. Da auch keine richtige Aufreinigung, sondern nur das oberflächliche Waschen der Produkte möglich war, kann es sein, dass ein Teil des hohen Substitutionsgrads auf ionisch gebundene Phosphatgruppen zurückzuführen ist. Dass die Phosphorylierung mit der Methode nach AMARAL et al. erfolgreich durchgeführt werden konnte, steht jedoch außer Frage, da sich die Löslichkeit des Polysaccharids deutlich geändert hat. Wie auch von NISHI et al. berichtet wird, führt ein zu hoher Substitutionsgrad möglicherweise zu inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Aminogruppen des Chitosans und den eingeführten Phosphatgruppen.^[123] Diese starken Wechselwirkungen könnten ein Grund dafür sein, dass sich das erhaltene phosphorylierte Chitosan nicht mehr lösen lässt.

Mit aufgereinigtem und acetyliertem Chitosan stellte sich die Reaktionsführung hingegen als schwierig heraus, da das Polysaccharid nach der Gefriertrocknung einem Watteschwamm gleicht. Für die voluminöse „Chitosanwatte“ war eine homogene Dispersion in 2-Butanol nicht möglich, da die Watte sehr schlecht gleichmäßig zerkleinert werden konnte. Zudem musste das Reaktionsvolumen, bedingt durch das hohe Volumen zu Masse Verhältnis des

gefriergetrockneten Chitosans, deutlich erhöht werden. Reaktionen, die mit acetyliertem Chitosan (DA 42 %) durchgeführt wurden, ergaben nach 48 Stunden nur einen Substitutionsgrad von ca. 0,34 trotz einer höheren Menge an zugegebenem Phosphorpentoxid verglichen mit den Reaktionen mit unbehandeltem Chitosanpulver. Dies könnte zum einen an der schlechten Dispersion des watteartigen Chitosans liegen, die wahrscheinlich dazu führt, dass nur eine oberflächliche Modifikation eintritt. Zum anderen könnte es der abweichenden Aufreinigungsprozedur geschuldet sein, da hier ein wasserlösliches Produkt erhalten wurde, das über Dialyse gereinigt werden konnte. Als Dialysemedium wurde im Anschluss an die Natriumchloridlösung 0,01 M Natronlauge verwendet, um die Aminogruppen des Chitosans zu deprotonieren und somit die gebundenen Chloridionen in das Dialysemedium freizusetzen. In den Ergebnissen der Elementaranalyse konnte für die Dialyse mit 0,01 M Natronlauge 1 Gew.-% Chlor im erhaltenen Produkt nachgewiesen werden. Im Vergleich zu 5-6 Gew.-% Chlor für die Aufreinigung ohne Natronlauge war dies eine deutliche Reduktion. Der Phosphorylierungsgrad des Chitosans wurde über die Elementaranalyse auf ca. 0,34 berechnet. Zusätzlich konnte im ^{31}P -NMR nach der Dialyse mit Natronlauge ein Peak erhalten werden, der auf eine erfolgreiche Phosphorylierung hinweist.

Somit scheint die Methode nach AMARAL et al. trotz des heterogenen Prozesses zur Phosphorylierung von Chitosanpulver und „Chitosanwatte“ geeignet zu sein. Das aus dem watteartigen Chitosan (DA 42 %) erhaltene wasserlösliche, phosphorylierte Chitosan (CSP) wurde in weiteren Versuchen zur Beschichtung von Titansubstraten und zur Nanopartikelbildung verwendet. Die Resultate dieser Untersuchungen werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

Phosphorylierung nach CÁRDENAS et al.

Eine weitere Methode zur Herstellung von phosphoryliertem Chitosan wird von CÁRDENAS et al. beschrieben.^[124] Hierfür wird Chitosan (DA 42 %), wie in Abbildung 5.4 gezeigt, mit Diethylchlorophosphat umgesetzt.

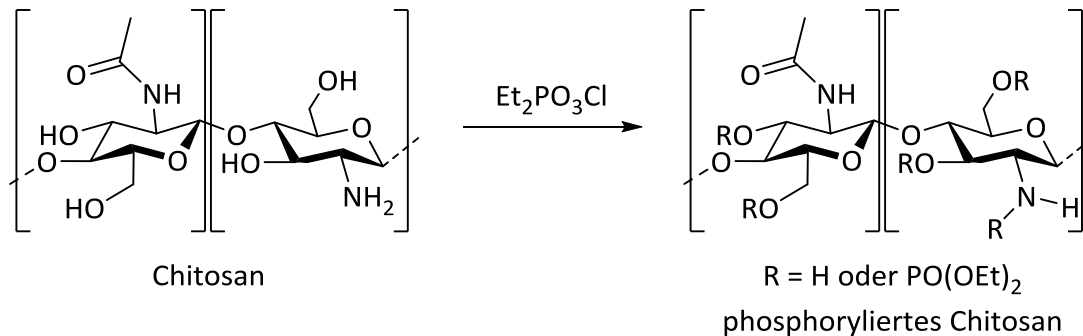


Abbildung 5.4: Phosphorylierung von Chitosan nach CÁRDENAS et al..^[124]

Das erhaltene Produkt wurde über Dialyse mit verdünnter Natronlauge aufgereinigt und zeigte in der Elementaranalyse nur noch Spuren von Chlor. Somit ließ sich der Phosphorylierungsgrad über Elementaranalyse ziemlich genau auf 1,19 bestimmen. Da über die Reaktion auch Ethylgruppen in das Polysaccharid eingeführt wurden, bietet auch das ¹H-NMR die Möglichkeit den Substitutionsgrad zu berechnen. Das Ergebnis hierfür stimmt gut mit dem der Elementaranalyse überein und lieferte einen Substitutionsgrad von 1,10. Auch das ³¹P-NMR weist auf die Anwesenheit von Phosphor im Polymer hin und bestätigt somit die erfolgreiche Phosphorylierung des Chitosans.

Das mit Diethylphosphatgruppen funktionalisierte Chitosan (CSDEP) hat keinen anionischen Charakter und kann dementsprechend nicht alleine zur Bildung von Nanopartikeln mit BMP-2 verwendet werden. Jedoch sollte die Nanopartikelbildung mit Tripolyphosphat und BMP-2 weiterhin möglich sein, weil diese über die noch vorhandenen Aminogruppen verläuft. Darüber hinaus bieten die eingeführten Diethylphosphatgruppen theoretisch die Möglichkeit an Titanoberflächen anzubinden. Aus diesem Grund wurde das erhaltene phosphorylierte Chitosan in weiteren Versuchen zur Beschichtung von Titansubstraten und zur Nanopartikelbildung eingesetzt.

5.1.2 Partikelcharakterisierung

Die Nanopartikelbildung des nach AMARAL et al. hergestellten CSP(42) mit Polylysin wurde über dynamische Lichtstreuung untersucht. Als Kontrollprobe wurden aus dem Polyanion Natriumalginat und dem Polykation Polylysin Nanopartikel hergestellt. Die erwünschte Partikelbildung aus CSP(42) und Polylysin konnte leider für keines der getesteten Mischungsverhältnisse von CSP(42) zu Polylysin (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 und 1:4) realisiert werden. Grund hierfür könnte der niedrige Phosphorylierungsgrad des Chitosans von ca. 0,34 oder ein störender Einfluss freier Aminogruppen des CSP(42) sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei CSP(42) um kein Polyanion handelt.

In weiteren Versuchen wurde die Nanopartikelbildung von CSP(42) und CSDEP(42) mit Tripolyphosphat getestet. Über den Einsatz von Tripolyphosphat konnten aus beiden phosphorylierten Chitosanen Nanopartikel hergestellt werden. Die Partikelbildung erfolgte über die Zugabe einer 1 mg/mL Tripolyphosphatlösung in Millipore zu einer 1 mg/mL CSP(42) oder CSDEP(42) Lösung in 0,1 % Essigsäure. In Abbildung 5.5 sind die Partikelgrößenverteilungen von zwei engverteilten Proben exemplarisch dargestellt. Dabei wurden für CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) sehr einheitliche Nanopartikel mit einem z-Average von 116 ± 51 nm und einem PDI von 0,20 erhalten. Im Falle von CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH) konnten etwas größere Nanopartikel mit einem z-Average von 193 ± 76 nm und einem etwas niedrigeren PDI von 0,16 hergestellt werden.

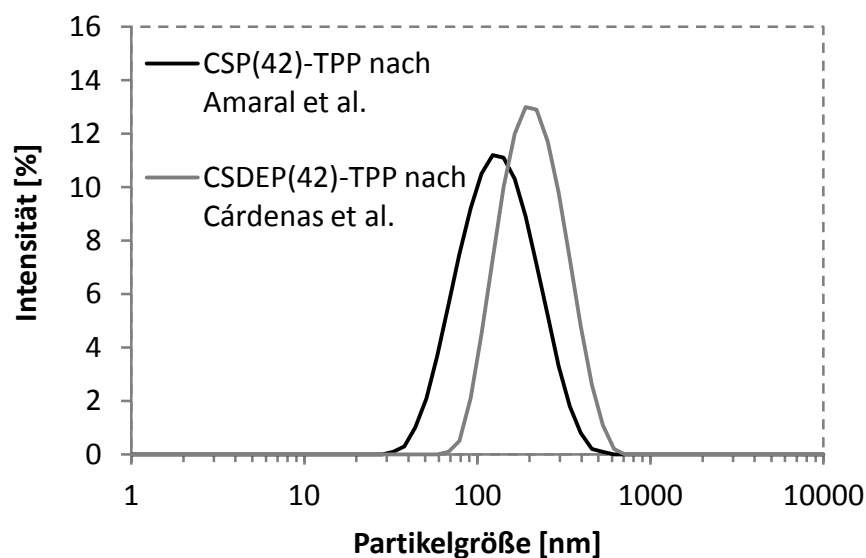


Abbildung 5.5: Partikelgrößenverteilung einer CSP-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) und einer CSDEP-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Untersuchungen zum Zetapotential der CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP Nanopartikel sind in Abbildung 5.6 gezeigt. Für beide Partikelsuspensionen wurde ein deutlich positives Zetapotential ermittelt, das für CSP(42)-TPP bei ca. 19 ± 5 mV und für CSDEP(42)-TPP bei ca. 15 ± 5 mV lag. Das positive Zetapotential der Partikel zeigt, dass auch nach den Phosphorylierungsreaktionen in beiden Polysacchariden noch protonierbare Aminogruppen vorliegen. Für die CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH) Nanopartikel wurde trotz eines höheren Chitosananteils im Vergleich zu den CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) ein niedrigeres Zetapotential gemessen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Aminogruppenanteil im CSDEP(42) aufgrund des hohen Substitutionsgrads im Vergleich zu CSP(42) geringer ist. Laut Elementaranalyse besteht CSDEP(42) zu 4,0 % aus Stickstoff, was für einen Milliliter CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension bedeutet, dass von den eingesetzten 833 μg CSDEP(42) nur etwa 33,4 μg auf die Stickstoffatome der Aminogruppen entfallen. Für einen Milliliter CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) liegt der Wert bei ca. 50,1 μg für 750 μg eingesetztes CSP(42). Dementsprechend stehen in den CSDEP(42)-TPP Nanopartikeln weniger Aminogruppen zur Protonierung zur Verfügung, was letztendlich in einem niedrigeren Zetapotential resultiert.

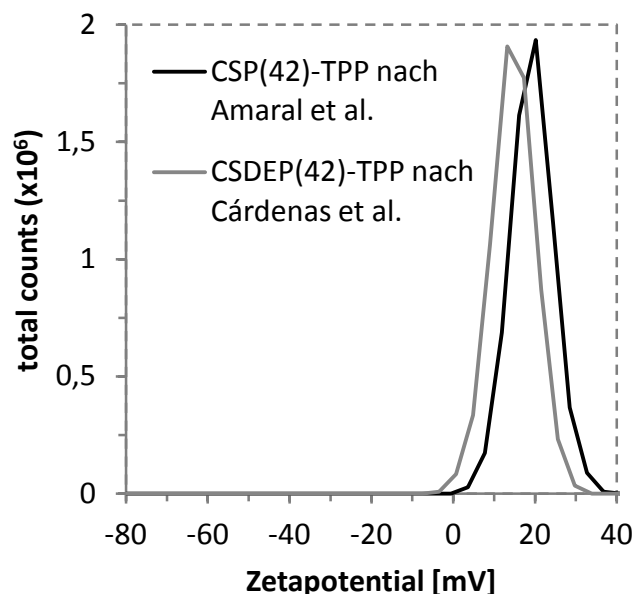


Abbildung 5.6: Zetapotential einer CSP-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) und einer CSDEP-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Die Untersuchungen zur Partikelbildung deuten darauf hin, dass in den Phosphorylierungsreaktionen bevorzugt die Hydroxylgruppen des Chitosans umgesetzt werden, da die Aminogruppen auch nach den Reaktionen zur Partikelbildung zur Verfügung stehen. Dies konnte

über die erfolgreiche Nanopartikelbildung mit Tripolyphosphat gezeigt werden und stimmt mit den analytischen Beobachtungen von AMARAL et al. überein.^[122] Die Bildung von Nanopartikeln mit Polykationen konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Da sich jedoch mit Hilfe von Tripolyphosphat homogene Nanopartikelsuspensionen herstellen ließen, konnten auch CSP(42)- und CSDEP(42)-Nanopartikel in Beschichtungsversuchen getestet werden.

5.1.3 Beschichtung

Als wichtigste Eigenschaft der phosphorylierten Chitosane galt es zu charakterisieren, ob eine stabile Immobilisierung auf Titanoberflächen durchgeführt werden kann. Dementsprechend wurden die phosphorylierten Chitosane als Reinsubstanz zur Beschichtung von Titan substraten mittels Sprühbeschichtung verwendet. Nach der Beschichtung wurden die Proben für 18 Stunden bei 37 °C oder 120 °C gelagert, um die in Abbildung 5.7 gezeigte Anbindungsreaktion zu fördern. Die Temperatur von 37 °C wurde hier gewählt, da dies für ein proteinbeladenes Wirkstofffreisetzungssystem die maximale Tempertemperatur darstellt, bei der keine Schäden am eingelagerten Protein auftreten sollten. Als Temperatur zum Anbinden von Phosphonaten an Titanoberflächen, siehe ADDEN et al. und LORENZ et al., wurde die Temperatur von 120 °C zum Tempern der Proben übernommen, um Unterschiede zwischen den beiden Temperbedingungen aufzuklären.^[9,10] Um für die hohe Temperatur den Einfluss der wachsenden Titanoxidschicht auf die Schichtdicke zu berücksichtigen, wurde als Referenz blankes Titan getempert und charakterisiert. Nach einer Temperzeit von 18 Stunden konnte eine Titanoxidschichtdickenzunahme von ca. 1,5 nm ermittelt werden.

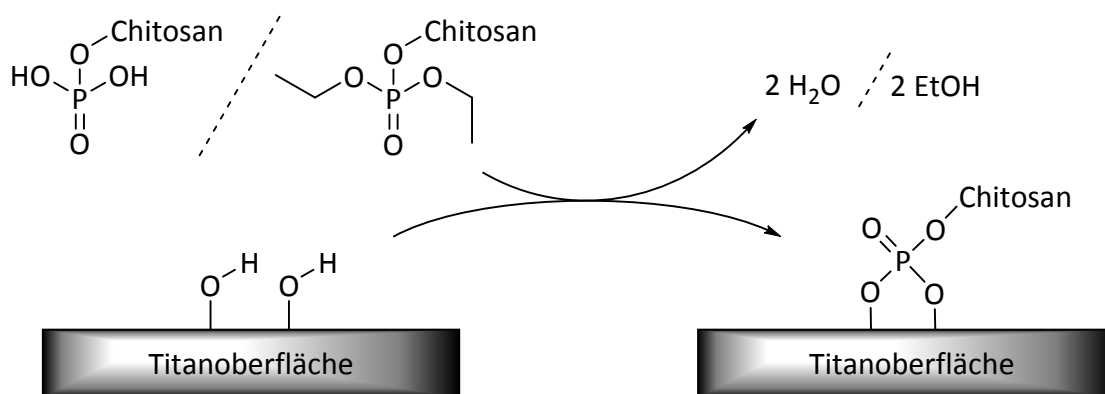


Abbildung 5.7: Anbindung von phosphoryliertem Chitosan an Titanoberflächen.

Die erhaltenen Beschichtungen wurden via Ellipsometrie charakterisiert. Für das nach AMARAL et al. hergestellte CSP(42) (1 mg/mL, 0,1 % AcOH) ergaben sich nach einminütigem Aufsprühen der reinen Polymerlösung Schichtdicken von 27 ± 2 nm. Der Einfluss der anschließend durchgeführten Temperung bei 37 bzw. 120 °C auf die Stabilität der Beschichtungen wurde über Ultraschallbehandlungen in verschiedenen Flüssigkeiten getestet und ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Hierbei wurden die Reinigungsschritte für alle Plättchen nacheinander durchgeführt und die Plättchen für die Messungen entnommen und getrocknet. Es ist zu erkennen, dass sich die Probenreihen bis zur Behandlung mit 1 %-iger Essigsäure im Ultraschallbad vergleichbar verhalten. Nach dem Waschen in Essigsäure wurde die Beschichtung der bei 37 °C getemperten Titanplättchen nahezu vollständig entfernt, wohingegen für die bei 120 °C gelagerten Proben noch eine Schicht von $5,3 \pm 1,5$ nm nachweisbar war. Dies spricht dafür, dass eine erhöhte Tempertemperatur die Stabilität der Beschichtung erhöht und möglicherweise zu einer Anbindung des CSP(42) an die Titanoberfläche führt. Eine abschließende Reinigung der Oberfläche mit einem Wattestäbchen und Millipore führte auch für die 120 °C Proben zur vollständigen Entfernung der Beschichtung.

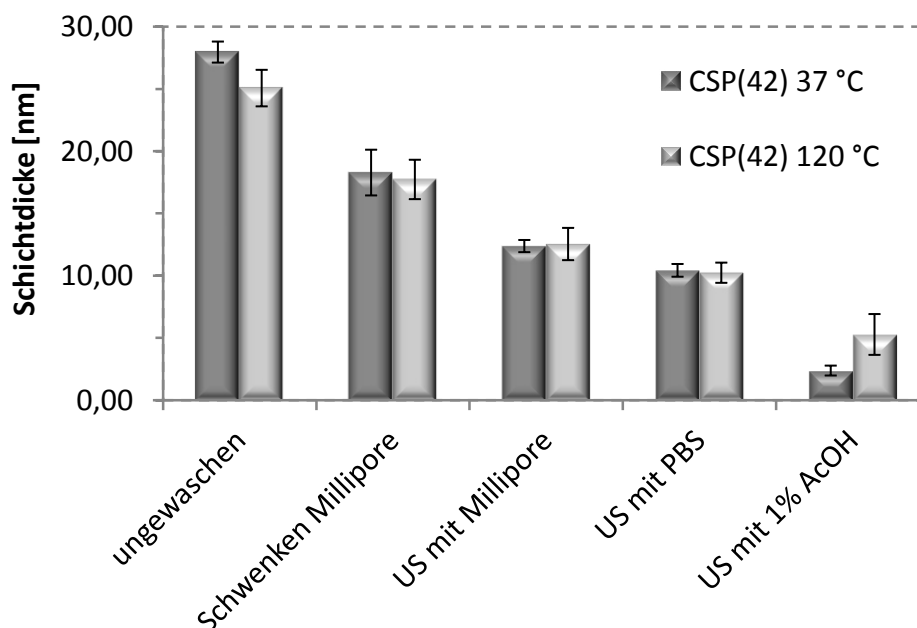


Abbildung 5.8: Untersuchung zum Einfluss der Tempertemperatur auf die Beschichtungsstabilität von Titansubstraten, die mit einer 1 mg/mL Lösung von phosphoryliertem Chitosan(CSP(42)) in 0,1 %-iger Essigsäure für je eine Minute besprüht wurden (US=Reinigung im Ultraschallbad).

Für das nach CARDENAS et al. hergestellte CSDEP(42) (1 mg/mL, 0,1 % AcOH) wurden nach einer Sprühdauer von einer Minute 14 ± 2 nm als Schichtdicken erhalten. Verglichen mit den

CSP(42) Proben fielen die Beschichtungen etwa halb so dick aus, obwohl alle Beschichtungsparameter konstant gehalten wurden und die Polysaccharidlösungen identische Massen an Polymer pro Volumen aufwiesen. Während des Sprühprozesses sollte also pro Zeit die gleiche Menge an Polysaccharid auf den Titansubstraten abgeschieden werden. Eine Erklärung hierfür könnte der hydrophilere Charakter des CSP(42) sein, der die Einlagerung von Wasser in die aufgesprühten Filme begünstigt und somit in der Herstellung dickerer Beschichtungen resultiert. Darüber hinaus ist es denkbar, dass es aufgrund des höheren Molekulargewichts des CSDEP(42) (≈ 349 g/monomol via Elementaranalyse) im Vergleich zum CSP(42) (≈ 209 g/monomol via Elementaranalyse) zur Ausbildung eines dichteren Films kommt und folglich die Schichtdicke der CSDEP(42) Beschichtungen verringert wird.

In Abbildung 5.9 sind, wie zuvor für CSP(42) gezeigt, die Stabilitätstest der CSDEP(42) Beschichtungen dargestellt. Für die CSDEP(42) Proben ist der Unterschied zwischen den beiden getesteten Tempertemperaturen deutlich ausgeprägter als für die CSP(42) Beschichtungen.

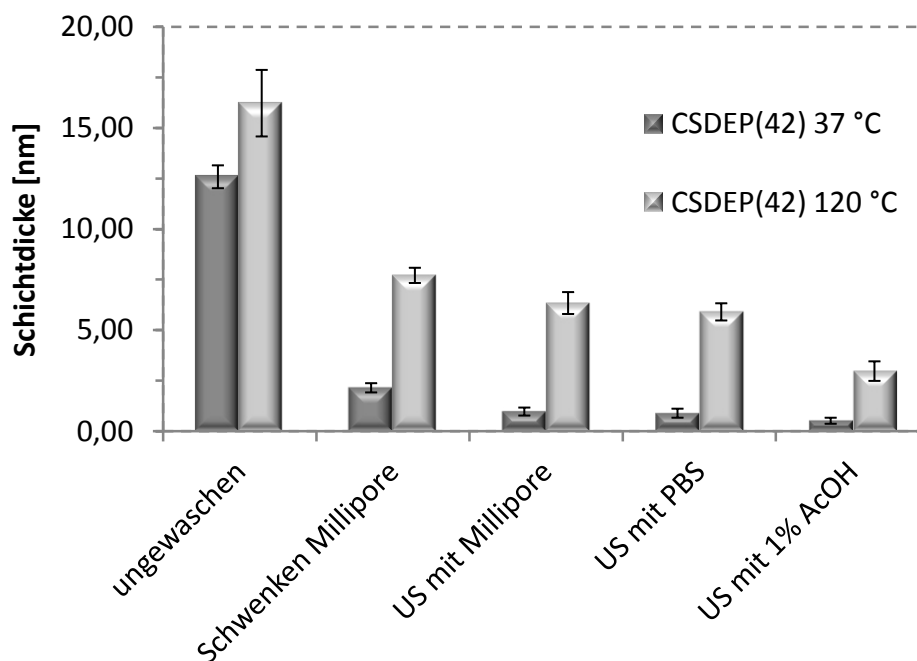


Abbildung 5.9: Untersuchung zum Einfluss der Tempertemperatur auf die Beschichtungsstabilität von Titansubstraten, die mit einer 1 mg/mL Lösung von phosphoryliertem Chitosan(CSDEP(42)) in 0,1 %-iger Essigsäure für je eine Minute besprüht wurden (US=Reinigung im Ultraschallbad).

Es ist bereits nach dem Schwenken der beschichteten Proben in Millipore zu erkennen, dass die bei 37 °C getemperten Beschichtungen sich nahezu vollständig abgelöst haben. Die Beschichtungen der Titansubstrate, die bei 120 °C getempert wurden, zeigen im Vergleich dazu eine deutlich höhere Stabilität, da selbst nach dem Waschen in 1 %-iger Essigsäure noch eine

Schichtdicke von ca. 3 nm gemessen werden konnte. Auch hier ist die erhöhte Stabilität der bei 120 °C getemperten Proben möglicherweise auf eine kovalente Anbindung des CSDEP(42) an die Titansubstrate zurückzuführen. Jedoch unterscheidet sich die Schichtdicke nach der Reinigung in Essigsäure nicht mehr stark von der bei 120 °C getemperten, blanken Referenzprobe mit einer Oxidschicht von ca. 1,5 nm. Die abschließende Reinigung mit einem Wattestäbchen und Millipore hat wiederum die vollständige Entfernung der Beschichtungen zur Folge.

Nachdem für das Tempern der reinen phosphorylierten Chitosane bei 120 °C eine Zunahme der Beschichtungsstabilität gezeigt werden konnte, wurden auch Beschichtungen mit den in Kapitel 5.1.2 vorgestellten Nanopartikeln hergestellt. Die Ergebnisse für eine dreiminütige Sprühbeschichtung von Titansubstraten mit einer CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension sind in Abbildung 5.10 gezeigt.

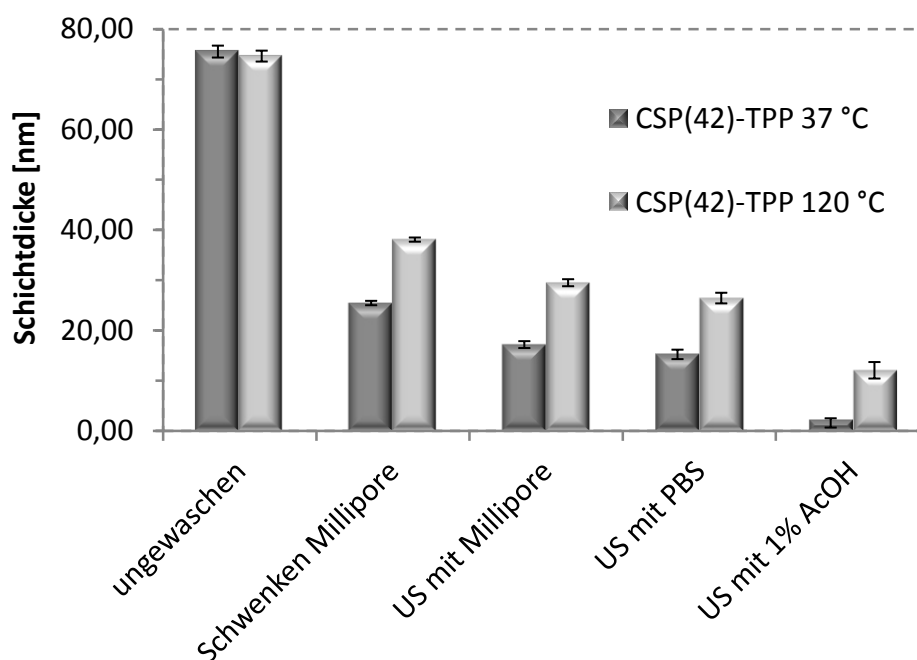


Abbildung 5.10: Untersuchung zum Einfluss der Tempertemperatur auf die Beschichtungsstabilität von Titansubstraten, die mit einer CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension für je drei Minuten besprüht wurden (US=Reinigung im Ultraschallbad).

Auch in dieser Versuchsreihe konnte der zuvor beschriebene Einfluss der Tempertemperatur auf die Stabilität der Beschichtung bestätigt werden. Dass das CSP(42) möglicherweise an Titanoberflächen anbinden kann, wird zusätzlich durch den Verbleib einer 12 nm dicken Schicht nach dem Waschen in 1 %-iger Essigsäure unterstützt. Es ist jedoch anzumerken, dass mit den 12 nm nach den verschiedenen Reinigungsschritten nur eine dünne Grund-

schicht der ursprünglich 75 ± 1 nm dicken Beschichtung zurückbleibt. Somit scheint die Phosphorylierung nur einen Einfluss auf die Schicht direkt an der Titanoberfläche und nicht auf die Netzwerkstabilität der Partikel zu haben (mögliche kovalente Quervernetzung). Die Steigerung der Beschichtungsstabilität von CS-TPP Nanopartikeln ist demnach allein über die kovalente Anbindung an Titanoberflächen nicht möglich und muss höchstwahrscheinlich mit einer Steigerung der Netzwerkstabilität der Nanopartikel, also des resultierenden Beschichtungsfilms, kombiniert werden.

Auch Beschichtungen, die über eine dreiminütige Sprühbeschichtung mit einer CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH) Nanopartikelsuspension erhalten wurden, wurden mittels Ellipsometrie untersucht. Die hergestellten Beschichtungen zeigten nicht den üblichen Farbverlauf (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 4.4), der auch für die CSP(42)-TPP Beschichtungen erhalten wurde, sondern ergaben einen matten, weißlichen Film auf den Titanplättchen. Des Weiteren waren auch die Nanopartikelbeschichtungen, die mit CSDEP(42)-TPP hergestellt wurden dünner (46 ± 7 nm) als die CSP(42)-TPP Beschichtungen (75 ± 1 nm). In Abbildung 5.11 sind die Ergebnisse zu den Stabilitätsuntersuchungen der CSDEP(42)-TPP Beschichtungen dargestellt.

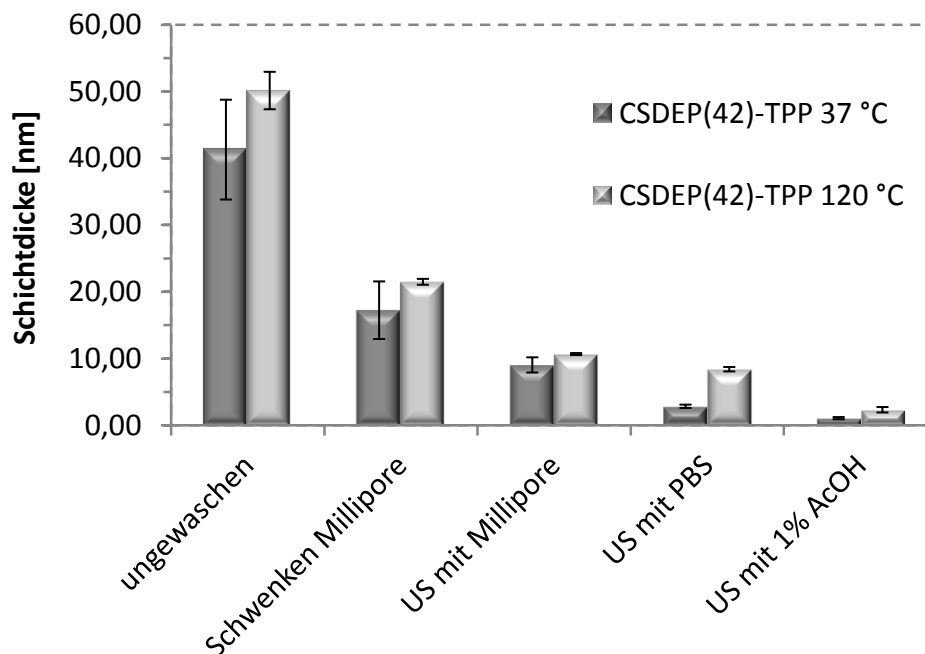


Abbildung 5.11: Untersuchung zum Einfluss der Tempertemperatur auf die Beschichtungsstabilität von Titansubstraten, die mit einer CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH) Nanopartikelsuspension für je drei Minuten besprüht wurden (US=Reinigung im Ultraschallbad).

Nach der Reinigung mit PBS im Ultraschallbad wurde im Falle der niedrigen Tempertemperatur von 37 °C die Beschichtung nahezu vollständig entfernt, wohingegen für das Tempern bei 120 °C noch ca. 8 nm auf den Titansubstraten nachgewiesen werden konnten. Der anschließende Waschprozess in Essigsäure löste für die bei 120 °C getemperten Proben, wie für die Proben mit reinem CSDEP(42), weitere Teile der Beschichtung ab, so dass nur noch 2-3 nm zurückblieben. Auch hier ist, wie für die reinen CSDEP(42) Beschichtungen, kein großer Unterschied zur blanken Titanreferenz zu beobachten. Nach abschließender Reinigung mit einem Wattestab konnte auf den Titansubstraten keine Oberflächenbeschichtung mehr festgestellt werden.

Um Unterschiede zwischen Nanopartikelbeschichtungen mit Chitosan und phosphoryliertem Chitosan aufzuklären, wurden die Stabilitätstests von CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP mit einer identischen Versuchsreihe von CS(42)-TPP Nanopartikelbeschichtungen verglichen, siehe Abbildung 5.12.

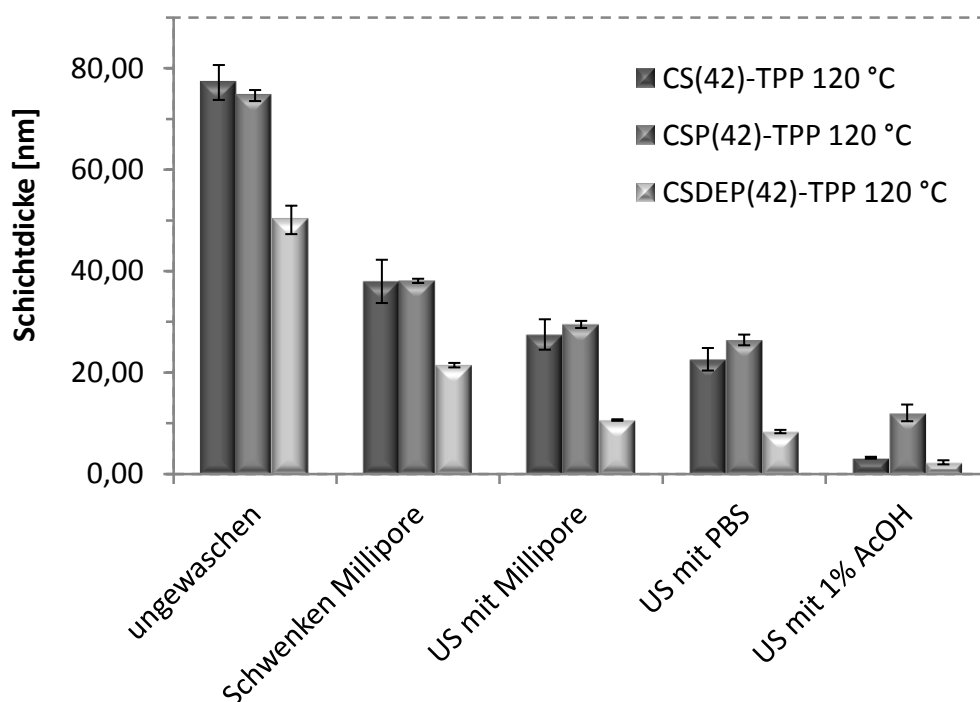


Abbildung 5.12: Vergleich der Beschichtungsstabilität von dreiminütigen Sprühbeschichtungen von Nanopartikelsuspensionen der phosphorylierten Chitosane(CSP und CSDEP) mit dreiminütigen Beschichtungen unphosphorylierter CS(42)-TPP Nanopartikel (US=Reinigung im Ultraschallbad).

Die CSDEP(42)-TPP Beschichtungen zeigen eine stetige Abnahme der Schichtdicke mit den Reinigungsschritten und im Vergleich mit dem CS(42)-TPP System keine Steigerung der Beschichtungsstabilität. Die Effekte der Reinigungsschritte auf die getesteten CSP(42)-TPP Be-

schichtungen gleichen den für CS(42)-TPP erhaltenen Ergebnissen. Auffällig ist hier die deutliche Steigerung der Säurebeständigkeit der Beschichtung. Dies deutet auf eine kovalent angebundene Grundsicht aus CSP(42) hin und verdeutlicht, dass sich die Phosphorylierung nicht auf die Stabilität der gesamten Partikelbeschichtung, sondern nur auf die mit Titan in Kontakt stehende Schicht auswirkt.

Abschließend kann gesagt werden, dass über eine Phosphorylierung des Chitosans die Stabilität der Grundsicht einer aufgespritzten Beschichtung durch Tempern bei 120 °C erhöht werden kann. Im Falle des nach AMARAL et al. hergestellten CSP(42) konnte auch für CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Beschichtungen im Vergleich zur CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Beschichtung eine erhöhte Grundsichtstabilität beobachtet werden. Die Ergebnisse der CSP(42) Beschichtungen deuten darauf hin, dass das phosphorylierte Chitosan stabil auf den Titansubstraten immobilisiert werden konnte. Für das Polysaccharid CSDEP(42) zeigen sich zwar Unterschiede zwischen den beiden Tempertemperaturen, jedoch ist hier über den Vergleich mit dem CS(42)-TPP System neben den dünner ausfallenden Beschichtungen keine Veränderung erkennbar. Dementsprechend scheint es hier nicht zu einer stabilen Immobilisierung des CSDEP(42) zu kommen, obwohl das CSDEP(42) verglichen mit dem CSP(42) über einen höheren Phosphorylierungsgrad verfügt. Wahrscheinlich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Ethanolatgruppe der Diethylphosphatgruppen im Vergleich zu den Hydroxidionen der Phosphatgruppen des CSP(42) die schlechtere Abgangsgruppe darstellt.

Da in den durchgeführten Versuchen nur Effekte für die hohe Tempertemperatur von 120 °C beobachtet werden konnten, ist diese Methode nicht für den geplanten Verwendungszweck der Nanopartikel geeignet. Der Grund hierfür ist, dass die Nanopartikel mit BMP-2 beladen werden sollen und das Tempern bei 120 °C eine Denaturierung des Proteins und demzufolge den Verlust seiner biologischen Aktivität zur Folge hätte.

5.1.4 Übersicht: Phosphoryliertes Chitosan

Nach den Methoden von AMARAL et al. und CÁRDENAS et al. konnten die phosphorylierten Chitosane CSP(42) mit einem Substitutionsgrad von ca. 0,34 und CSDEP(42) mit einem Substitutionsgrad von ca. 1,2 hergestellt werden. Die Charakterisierung erfolgte hierbei über ^1H -NMR, ^{31}P -NMR und Elementaranalyse. Die angestrebte Nanopartikelbildung mit Polykationen konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht verwirklicht werden. Jedoch ließen

sich über die Vernetzung mit Tripolyphosphat Nanopartikel bilden. CSP(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspensionen konnten mit einem PDI von 0,20, einem z-Average von 116 ± 51 nm und einem Zetapotential von 19 ± 5 mV hergestellt werden. Im Falle von CSDEP(42) wurden CSDEP(42)-TPP (5:1, 1 mg/mL, 0,083 % AcOH) Nanopartikel mit einem z-Average von 193 ± 76 nm, einem PDI von 0,16 und einem Zetapotential von 15 ± 5 mV erhalten. In Beschichtungsversuchen wurden die modifizierten Chitosane als Reinsubstanzen zur Beschichtung von Titansubstraten verwendet. Tests zur Stabilität der Beschichtungen zeigten, dass das Tempern der Proben bei 120 °C im Vergleich zu 37 °C eine erhöhte Stabilität der Beschichtung zur Folge hat. Diese Beobachtung konnte über Sprühbeschichtungen mit CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP Nanopartikeln bestätigt werden und deutet auf ein Anbinden der phosphorylierten Chitosane an die Titanoberfläche hin. Ein Vergleich der Sprühbeschichtungen von CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP Nanopartikeln mit CS(42)-TPP Sprühbeschichtungen zeigte jedoch, dass nur für die CSP(42)-TPP Beschichtung eine Steigerung der Beschichtungsstabilität erzielt werden konnte. Für CSDEP(42)-TPP Beschichtungen konnte kein Stabilitätsunterschied zu den CS(42)-TPP Beschichtungen festgestellt werden. Die für CSP(42) erreichte Stabilitätssteigerung bezieht sich jedoch nur auf die Stabilität der Grundsicht, die mit dem Titansubstrat in Kontakt steht. Darüber hinaus sind die Temperbedingungen von 120 °C für ein proteinbeladenes Wirkstofffreisetzungssystem nicht umsetzbar, da von einer Denaturierung des Proteins ausgegangen werden kann. Somit scheint die Phosphorylierung von Chitosan nicht geeignet, um die Stabilität von wirkstoffbeladenen CS(42)-TPP Beschichtungen zu erhöhen.

5.1.5 Ausblick

Über das Thema der phosphorylierten Chitosane wurde in dieser Arbeit bereits ein Ansatz präsentiert, der eine Steigerung der Beschichtungsstabilität von Chitosan-Tripolyphosphat Nanopartikeln verfolgt, um eine zu schnelle Freisetzung oder sogar den Abtransport des Wirkstoffes zu verhindern. In den Untersuchungen konnte jedoch nur die Stabilität der mit Titan in Kontakt stehenden Grundsicht erhöht werden. Dementsprechend wäre die Steigerung der Partikelstabilität oder die Verringerung der Löslichkeit ein interessanter Ansatz, um die Beschichtungsablösung und somit die Wirkstofffreisetzung zu verlangsamen. Ein möglicher Ansatz könnte hier die Ermittlung eines Acetylierungsgrades des Chitosans sein, über den die Löslichkeit und Biodegradierbarkeit des Chitosan angepasst und weiter optimiert werden könnte.

5.2 Chitosan (42) – „DNA“ Nanopartikel^{34,35}

Neben den Untersuchungen zur Phosphorylierung von Chitosan wurde auch ein Ansatz verfolgt, der das Tripolyphosphat aus dem CS(42)-TPP System (Kapitel 4.2) durch einen aktiven Partikelbaustein ersetzt. Angedacht waren DNA- oder RNA-Fragmente, die über die Nanopartikel, zusätzlich zum Transport eines Wirkstoffs, Informationen übermitteln („gene delivery“). Von TALVITIE et al. konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist aus Chitosan (Polykation) und Plasmid-DNA als Polyanion Nanopartikel herzustellen.^[128] Auch in Untersuchungen von CHEN et al. wurde die Herstellung von Nanopartikeln aus Chitosan und siRNA beschrieben.^[31] Ziel der Untersuchungen war deshalb, die Herstellung von DNA-vernetzten Nanopartikeln mit dem biologisch leicht abbaubaren, acetylierten CS(42) zu testen. Darüber hinaus sollte die Degradierbarkeit der Partikel und die Eignung zur Beschichtung von Titansubstraten charakterisiert werden. Als DNA-Fragment wurde ein Desoxyribonukleinsäureoligomer verwendet. Es handelte sich um das in Abbildung 5.13 dargestellte Thymidin-Pentamer (5'-T-T-T-T-T-3'), das im Folgenden mit ThP abgekürzt wird.

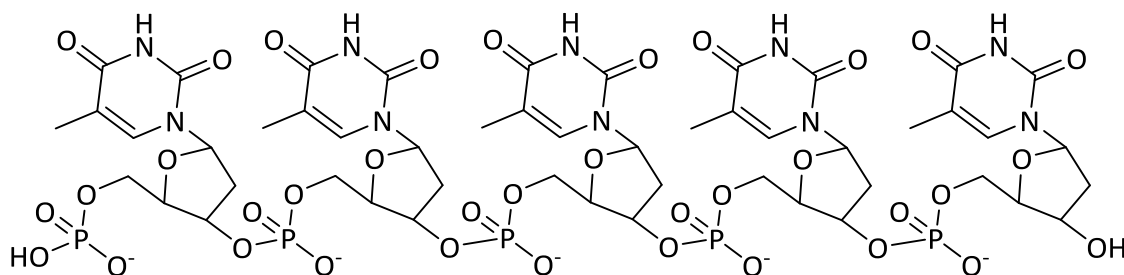


Abbildung 5.13: Strukturformel eines Thymidin-Pentamers (5'-T-T-T-T-T-3').

5.2.1 Partikelcharakterisierung

Die Partikelbildung erfolgte auch hier über Zugabe der ThP-Lösung zu einer Chitosanlösung. In Abbildung 5.14 ist die Partikelgrößenverteilung von CS(42)-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) dargestellt. Die erhaltenen Nanopartikel haben einen z-Average von 277 ± 146 nm mit einem PDI von 0,28. Einige Partikelgrößenmessungen wiesen hier jedoch kleine Schultern und Peaks vor dem Hauptpeak auf, was auf die Anwesenheit kleinerer Partikel neben der in Abbildung 5.14 gezeigten monomodalen Partikelgrößenverteilung hindeutet. Aufgrund der Messtechnik werden die kleinen Partikel aber durch die hohe Streuintensität der größeren

³⁴ Teile der Arbeiten wurden von der Forschungspraktikantin Judith Krautwurst durchgeführt.

³⁵ Teile und Vorarbeiten dieses Kapitels wurden bereits in einem Tagungsband „Oberflächentechnik für die Praxis“^[127] veröffentlicht.

Partikel überdeckt. Somit sind die CS(42)-ThP Nanopartikel wahrscheinlich nicht so einheitlich, wie es in der Partikelgrößenverteilung suggeriert wird.

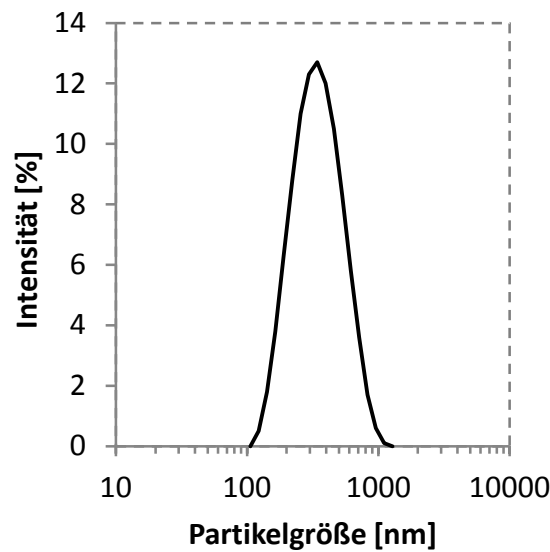


Abbildung 5.14: Partikelgrößenverteilung einer CS-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Die Messung des Zetapotentials ist in Abbildung 5.15 zu sehen und zeigt für die CS(42)-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension einen Wert von 25 ± 5 mV. Das Zetapotential ist etwas höher als das der in Kapitel 4.2.1 vorgestellten CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel, obwohl der Chitosananteil um 33 % niedriger ist. Dies ist auf das geringere Ladung-zu-Masse Verhältnis des ThPs im Vergleich zum TPP zurückzuführen.

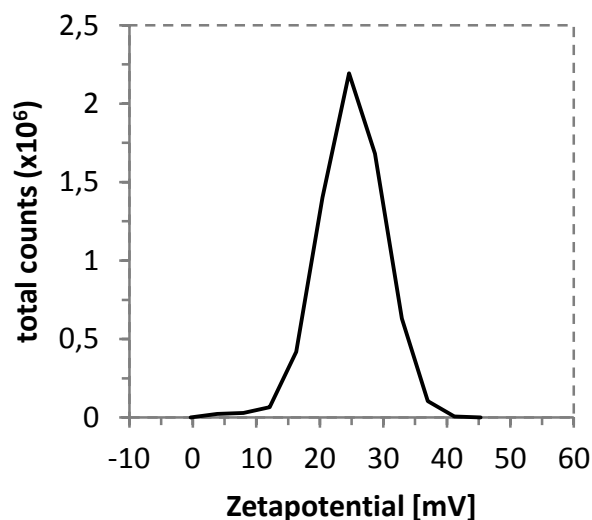


Abbildung 5.15: Zetapotential einer CS-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Die Herstellung relativ eng verteilter Nanopartikel aus dem acetylierten Chitosan CS(42) und dem Thymidin-Pentamer ist den Daten zufolge möglich. In weiterführenden Untersuchungen konnte sogar für das formal nur einfach negativ geladene Natriumthymidintriphosphat (dTTP), siehe Abbildung 5.16, die Ausbildung von Nanopartikeln mit CS(42) beobachtet werden. dTTP ist ein Grundbaustein der DNA und eines von vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotiden, die zur Biosynthese von DNA verwendet werden.

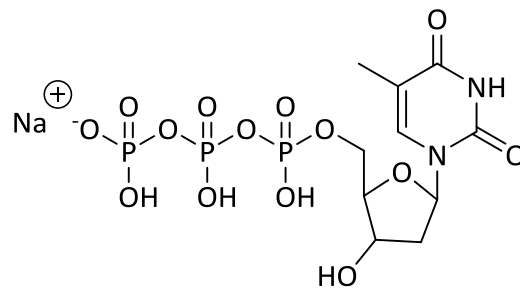


Abbildung 5.16: Strukturformel von Natriumthymidintriphosphat (dTTP).

Eine für die Zusammensetzung CS(42)-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) erhaltene Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Die Verteilung mit einem z-Average von 160 ± 29 nm und der PDI von 0,03 zeigen, dass es sich um eine nahezu monomodale Partikelgrößenverteilung handelt.

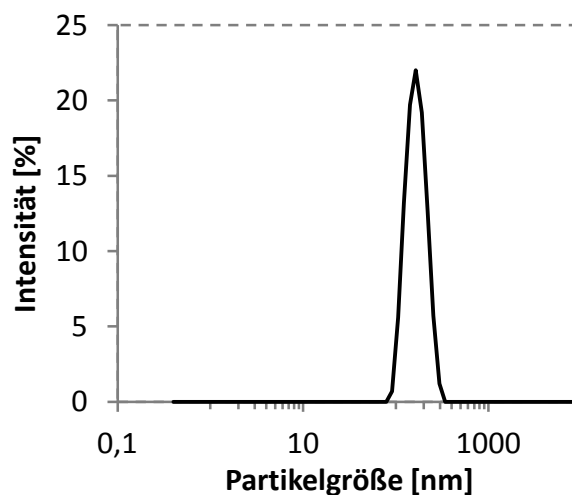


Abbildung 5.17: Partikelgrößenverteilung einer CS-ThTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Anzumerken ist hier, dass der Partikelbildungsmechanismus unklar ist, da über die einfach negative Ladung des Natriumthymidintriphosphats keine Vernetzung der Chitosanketten möglich ist und es somit zu einer Deprotonierung der Phosphatgruppen oder der Hydroxylgruppe der Desoxyribose kommen muss. Diese ist jedoch in dem vorhandenen, leicht sauren

Millieu unwahrscheinlich. Des Weiteren sollten mögliche Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den protonierten Aminogruppen des Chitosans und partiell negativ geladenen Gruppen des dTTPs zur Bildung eines stabilen Nanopartikelsystem nicht ausreichend sein. Die CS(42)-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Partikel, die sich trotz der Widersprüche bilden, weisen ein leicht positives Zetapotential von ca. 9 ± 7 mV auf, siehe Abbildung 5.18.

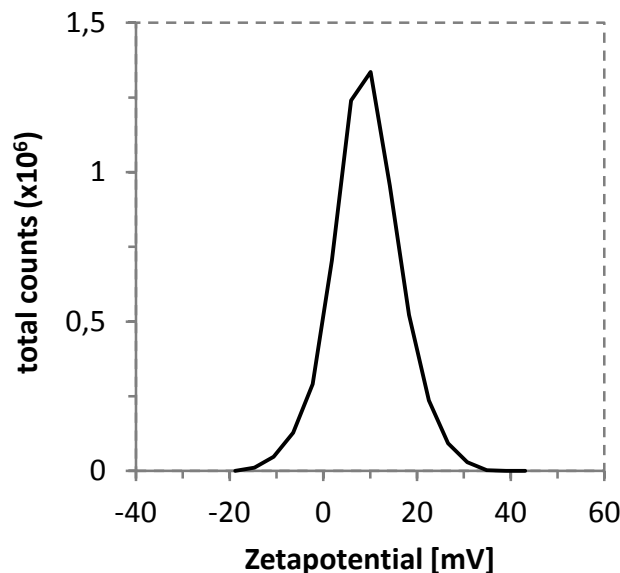


Abbildung 5.18: Zetapotential einer CS-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspension.

Verglichen mit dem Zetapotential der CS(42)-ThP Nanopartikel (25 ± 5 mV) ist das Zetapotential der CS(42)-dTTP Partikel trotz des gleichen Chitosananteils mit 9 ± 7 mV deutlich niedriger. Da das Ladung-zu-Masse Verhältnis des dTTPs niedriger ist als das des ThPs wäre eigentlich ein höherer Wert für das Zetapotential der CS(42)-dTTP Nanopartikel zu erwarten. Der gemessene niedrige Wert spricht dementsprechend dafür, dass es entgegen der Erwartungen zur Deprotonierung der Triphosphatgruppe des dTTPs kommt. Dies würde die Bildung von Nanopartikeln über das mehrfach negativ geladenen Anion ermöglichen und die resultierende Ladung der Nanopartikel aufgrund des höheren Anteils negativer Ladungen verringern.

Partikeldegradation

In Degradationsuntersuchungen zu den anfänglich dargestellten CS(42)-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln mit Lysozym konnte, wie für das CS(42)-TPP System, ein Einfluss des Lysozyms auf die Nanopartikel beobachtet werden. Die Zugabe von $1,5 \mu\text{g/mL}$ Lysozym führte zu einer schnellen Abnahme der Partikelgröße innerhalb der ersten Stunden, sie-

he Abbildung 5.19. Anschließend stagnierte die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex der Nanopartikelsuspension verringerte sich weiterhin fortlaufend. Nach etwa drei Tagen erreichte der PDI sein Minimum bei ca. 0,13 was einer Halbierung des ursprünglichen Wertes entspricht. Auch die Partikelgröße sinkt nach der zu Beginn beobachteten Stagnation im Verlauf von sieben Tagen auf ca. 215 nm ab. Somit konnte über die Zugabe von Lysozym die Partikelgröße der CS(42)-ThP Nanopartikelsuspension in sieben Tagen um ca. 20 % gesenkt und die Verteilungsbreite halbiert werden. Dies verdeutlicht, dass ein zeitabhängiger Prozess in der Nanopartikelsuspension abläuft, der auf die Degradation des Chitosans durch Lysozym zurückzuführen ist. Kontrollmessungen einer reinen CS(42)-ThP Nanopartikelsuspension bei 37 °C ohne Zugabe von Lysozym ergaben keine Veränderungen der Partikelgröße oder des PDI innerhalb des zuvor beschriebenen Zeitraums.

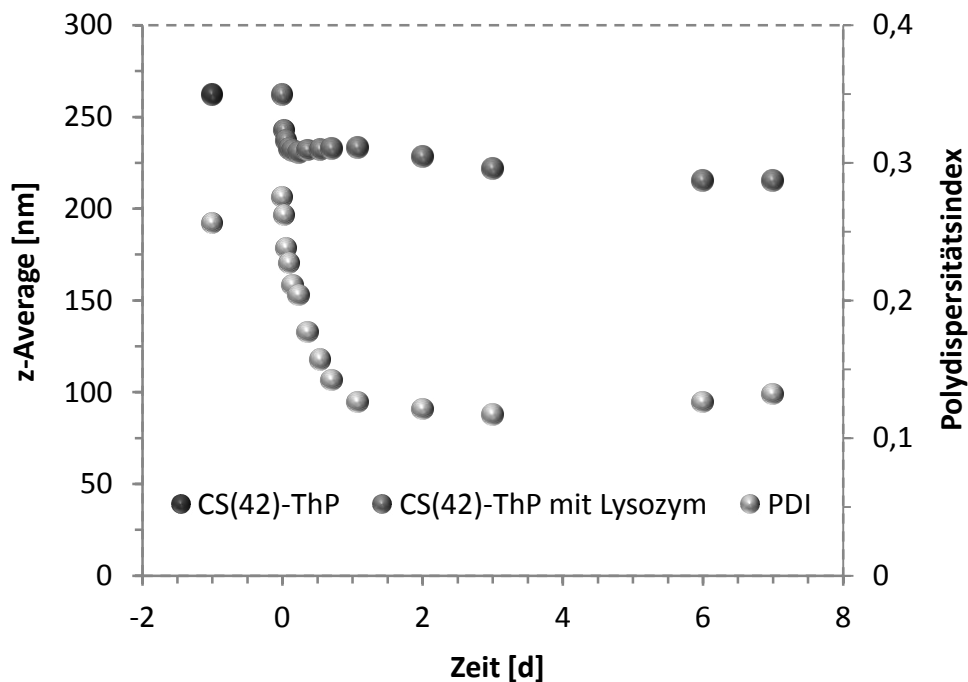


Abbildung 5.19: Partikelgrößenmessung von CS-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 37 °C während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym.

Ein Einfluss von Lysozym auf CS(42)-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel konnte ebenfalls beobachtet werden. In Abbildung 5.20 ist zu sehen, wie die Partikelgröße nach der Zugabe von 1,5 µg/mL Lysozym ansteigt. Der PDI der Nanopartikelsuspension bleibt dabei nahezu unverändert in einem sehr niedrigen Bereich von 0,01-0,04. Nach etwa einem Tag findet ein Sprung von 300 nm auf 400 nm statt. Daraufhin wachsen die Partikel weiter bis auf

einen z-Average von ca. 500 nm. In den letzten Messungen konnte eine leichte Sedimentation der Nanopartikel beobachtet werden, die auf die Größenzunahme der Partikel zurückzuführen ist. Dementsprechend sind die Messergebnisse ab dem zweiten Tag eher Näherungswerte, da hier die Brown'sche Diffusion der Partikel durch die Sedimentation beeinflusst wird und somit die Voraussetzungen für eine fehlerfreie dynamische Lichtstreuung nicht mehr erfüllt werden. Die starke Zunahme der Partikelgröße zeigt aber deutlich, dass Lysozym einen Effekt auf die CS(42)-dTTP Nanopartikel hat. Die Größenzunahme ist hierbei wahrscheinlich auf eine Aufweitung des Partikelnetzwerks und eine später folgende Aggregation der Nanopartikel aufgrund der Degradation des Chitosananteils zurückzuführen. Eine Aggregation der Nanopartikel ist in diesem Fall naheliegend, da die CS(42)-dTTP Partikel über ein sehr geringes Zetapotential verfügen und somit die interpartikuläre Abstoßung klein ist.

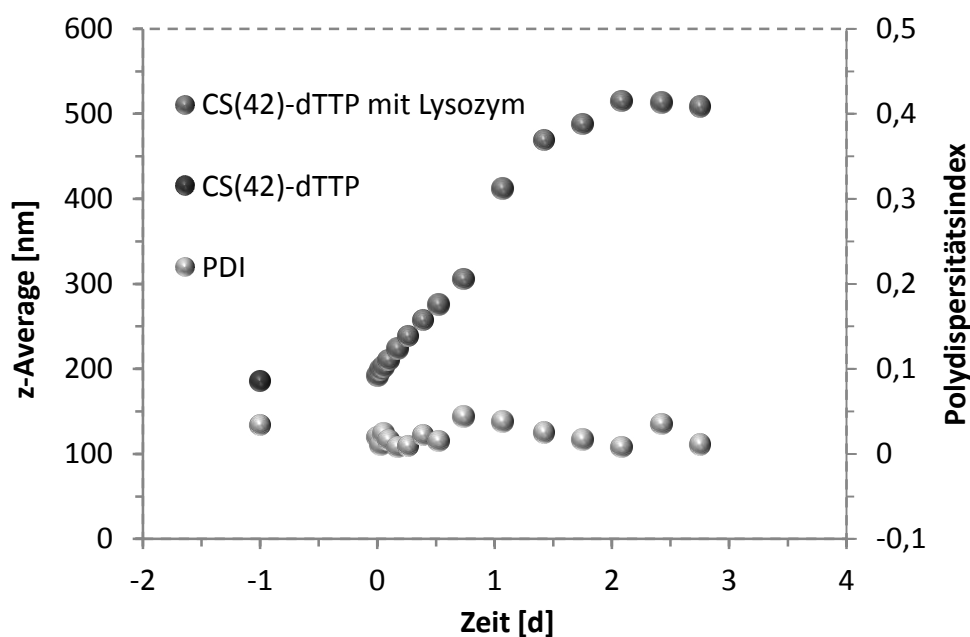


Abbildung 5.20: Partikelgrößenmessung von CS-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikeln bei 37 °C während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym.

5.2.2 Beschichtung

Untersuchungen an Titansubstraten, die über eine Sprühbeschichtung mit CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP Nanopartikeln beschichtet wurden, ergaben, dass die hergestellten Beschichtungen mit den für das CS(42)-TPP System aus Kapitel 4.2.2 erhaltenen Beschichtungen vergleichbar waren. Die Beschichtungen wurden mit einer CS(42)-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 %

AcOH) und einer CS(42)-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension über dreiminütiges Besprühen der Titansubstrate hergestellt. Als Resultat wurden für CS(42)-ThP Beschichtungen mit Filmdicken von 77 ± 1 nm und für CS(42)-dTTP von 79 ± 4 nm erhalten. In Schnelltests zur Stabilität der Beschichtungen zeigte sich, wie in Abbildung 5.21 dargestellt, dass auch die CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP Beschichtungen keine hohe Stabilität aufweisen. Die Beschichtungen lösten sich bereits nach Schwenken in Millipore Wasser und durch Waschen im Ultraschallbad mit Millipore Wasser ab. Somit ist auch für diese Beschichtungen *in vivo* ein sehr schnelles Ablöseverhalten zu erwarten.

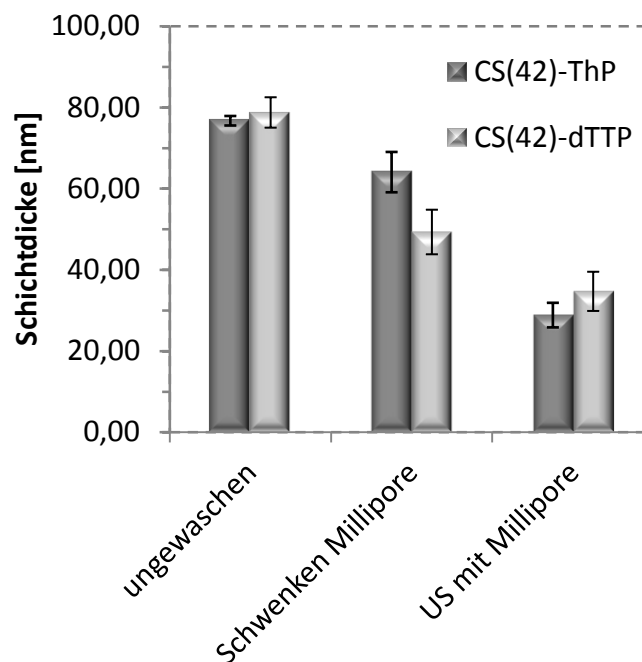


Abbildung 5.21: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von Chitosan-ThP und Chitosan-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, DA 42 %) Nanopartikelsuspensionsfilmen auf Titansubstraten zur Aufzeichnung der Beschichtungsstabilität während verschiedener Reinigungsschritte; je 3 Titanplättchen jeweils 3 Minuten sprühbeschichtet.

5.2.3 Überblick: Chitosan (42) – „DNA“ Nanopartikel

Mit dem acetylierten Chitosan CS(42) konnten aus einem Thymidin-Pentamer (ThP) CS(42)-ThP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel hergestellt werden. Die erhaltenen Nanopartikel wiesen einen z-Average von 277 ± 146 nm mit einem PDI von 0,28 und ein Zetapotential von 25 ± 5 mV auf. Auch die Kombination von CS(42) mit Natriumthymidintriphosphat führte zur Bildung von CS(42)-dTTP (1:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikeln. Diese zeig-

ten mit einem z-Average von 160 ± 29 nm und einem PDI von 0,03 eine sehr enge Partikelgrößenverteilung. Das Zetapotential der CS(42)-dTTP Nanopartikel war mit 9 ± 7 mV gering. Für beide Nanopartikelsysteme konnte der Einfluss von Lysozym auf die Nanopartikel bestätigt werden, was auf eine gute Biodegradabilität der Systeme hindeutet. Im Falle der CS(42)-ThP Nanopartikel zeigte sich dies über eine Homogenisierung der Partikelverteilung und eine leichte Größenabnahme, bei den CS(42)-dTTP Partikeln konnte eine starke Größenzunahme bis hin zur Sedimentation beobachtet werden. In ersten Beschichtungsversuchen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich die Nanopartikel zur Beschichtung von Titansubstraten mittels Sprühbeschichtung eignen und dass die hergestellten Beschichtungen in wässrigen Medien eine geringe Stabilität aufweisen. Abschließend kann gesagt werden, dass die Systeme zu CS(42)-„DNA“ Nanopartikeln einen sehr interessanten Ansatz zur Kombination von Informations- und Proteintransport in einem biologisch abbaubaren System darstellen.

5.2.4 Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über das biodegradable CS(42) Nanopartikel mit verschiedenen DNA- und RNA-Bausteinen hergestellt werden können. Somit steht theoretisch ein biologisch abbaubares Nanopartikelsystem zur Verfügung, dass zum einen über den Abbau die integrierten DNA/RNA-Information übermitteln kann und zum anderen auch noch als Wirkstofftransportsystem genutzt werden kann. Um dies weiter zu evaluieren, wäre der Einsatz von „biologisch aktiven“ DNA/RNA-Sequenzen denkbar, die *in vitro* einen definierten Prozess induzieren und dadurch den Nachweis der aktiven Informationsübermittlung über das Nanopartikelsystem ermöglichen. Darüber hinaus stellt die Untersuchung der Wirkstoffeinlagerung und -freisetzung eine sinnvolle Ergänzung zur Charakterisierung des Systems dar.

6 Zusammenfassung

Die medizinische Problemstellung des mangelnden Knochen/Implantat-Kontakts als häufige Folge bei Revisionsoperationen im Bereich der Hüftendoprothetik wurde in dieser Arbeit aufgegriffen. Ziel der Arbeit war es, über die Entwicklung eines Systems zur Beschichtung von Revisionsimplantaten die Integration der Implantate in den Knochen zu unterstützen. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zielsetzungen definiert: a) die erfolgreiche Immobilisierung des Wachstumsfaktors bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) auf Titanoberflächen zu realisieren und b) eine gezielte Freisetzung des unmodifizierten Wirkstoffs am Wirkort mit Hilfe eines Drug Delivery Systems zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde eine Steigerung der Menge an biologisch aktivem BMP-2 im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten (9 ng/cm^2) angestrebt. Als Sekundärziele wurden die Verwendung einer effektiven und einfach zu handhabenden Beschichtungsmethode und ein industriell leicht umsetzbarer Herstellungsprozess des Drug Delivery Systems verfolgt.

Um diese Zielsetzungen umzusetzen, wurde ein Nanopartikelsystem aus Chitosan mit einem Acetylierungsgrad von 17 % (CS(17)) und Natriumtripolyphosphat (TPP) getestet. Nach erfolgreichen Partikelbildungs- und Beschichtungsversuchen stellte sich für das CS(17)-TPP Nanopartikelsystem heraus, dass die Einlagerung von BMP-2 zu einer festen Integration in die Partikel führt und keine Freisetzung über Diffusion erfolgt. Aus diesem Grund wurde das biodegradable Nanopartikelsystem CS(42)-TPP mit einem stärker acetylierten Chitosan entwickelt. Die Degradabilität der CS(42)-TPP Nanopartikel durch physiologische Mengen des Serumproteins Lysozym konnte mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen werden. Zusätzlich resultierte die Anwendung eines „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Quantifizierung der Einlagerungseffizienz von BMP-2 in CS(42)-TPP Nanopartikel in einem sehr hohen Wert von 88-97 %. Über das Verfahren der Sprühbeschichtung war es möglich CS(42)-TPP Nanopartikel als homogene Beschichtung reproduzierbar auf Titanoberflächen aufzubringen. REM Untersuchungen an diesen Beschichtungen legen die Vermutung nahe, dass sich die CS(42)-TPP Nanopartikel während des Beschichtungsprozesses über Aggregation in einen ionisch vernetzten Film auf den Titansubstraten umlagern. In *in vitro* Studien mit BMP-2 an CS(42)-TPP-BMP-2 Filmen auf Titanoberflächen konnte mittels eines BRE-Luciferase Tests freigesetztes, biologisch aktives BMP-2 nachgewiesen werden ($142 \text{ ng/cm}^2 \equiv \text{ca. } 45 \% \text{ der aufgesprühten BMP-2 Menge}$). Zusätzlich konnte in einem *in vivo* Versuch in

Mäusen eine dosisabhängige, ektopische Knochenbildung durch das CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikelsystem induziert werden. Eine weiterführende *in vivo* Studie zeigte für CS(42)-TPP-BMP-2 beschichtete Titanzylinder und die Kontrollproben eine gute Osseointegration im Kaninchenmodell. In der Studie konnte kein negativer Einfluss der Beschichtung auf die Osseointegration *in vivo* beobachten werden. Des Weiteren konnte für die CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Titanzylinder im Vergleich zu den Kontrollproben im μ -CT eine Kallusbildung und die Bildung neuen Knochengewebes innerhalb des Zylinders festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass das BMP-2 in aktiver Form implantiert werden konnte und *in vivo* im Kaninchen Knochenwachstum induziert.

Alles in Allem zeigen die Ergebnisse, dass sich das biodegradable Drug Delivery System CS(42)-TPP in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 zur Beschichtung von Titansubstraten eignet und die Präsentation von biologisch aktivem BMP-2 an einer Titanoberfläche ermöglicht. Die biologisch aktive BMP-2-Menge konnte dabei im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten von 9 ng/cm² auf 142 ng/cm² deutlich gesteigert werden. Auch die Ergebnisse der *in vivo* Studien sind positiv zu bewerten und lassen auf eine effektive Unterstützung der Osseointegration von Implantaten schließen. Die eingesetzten Verfahren der Partikelbildung via ionischer Gelation und der Oberflächenmodifikation mittels Sprühbeschichtung erfüllen dabei die sekundären Zielsetzungen dieser Arbeit.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Möglichkeiten zur Weiterentwicklung des CS(42)-TPP-Systems untersucht. Die Ergebnisse der Phosphorylierung des CS(42) deuten dabei darauf hin, dass die Grundsicht einer Beschichtung aus phosphoryliertem Chitosan im Gegensatz zu CS(42) stabil auf einer Titanoberfläche immobilisiert werden kann. Dies bietet einen Ansatz um die Stabilität der Beschichtung zu erhöhen und ein zu schnelles Ablösen zu verhindern. Darüber hinaus zeigen die Partikelbildungsversuche mit CS(42) und „DNA-Fragmenten“, dass ebenfalls für eine Beschichtung geeignete Systeme erhalten werden, in denen das Tripolyphosphat des CS(42)-TPP Systems durch einen informationstragenden Baustein ersetzt werden und somit die Funktionalität des Drug Delivery Systems erhöht werden kann.

7 Theoretische Grundlagen der Analytik

Neben gängigen Standardmethoden, wie Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM), werden als analytische Methoden in dieser Arbeit noch dynamische Lichtstreuung (DLS), Ellipsometrie und Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) verwendet. Die DLS dient hier zur Charakterisierung der hergestellten Nanopartikel, während Ellipsometrie und XPS zur Oberflächenanalytik der beschichteten Titansubstrate verwendet werden.

7.1 Dynamische Lichtstreuung^[117]

Der Begriff Lichtstreuung steht für die Wechselwirkung einer elektromagnetischen Welle mit einem atomaren System. Hierbei regt das elektrische Feld einfallender Lichtwellen die Elektronenhüllen von Molekülen zu Schwingungen mit der Frequenz der Lichtwelle an. Dieses Phänomen führt zur Induktion eines Dipolmomentes im Molekül und zur Emission von Streulicht mit der Wellenlänge des anregenden Lichts.^[129] Die Intensität dieses Streulichts wird während einer dynamischen Lichtstreuung gemessen und zur Bestimmung von Partikeleigenschaften (zumeist der Partikelgröße) in einem Messbereich von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern verwendet.^[130] Das Lichtstreuverhalten von Partikeln hängt dabei stark von ihrer jeweiligen Größe ab und nimmt mit der Partikelgröße exponentiell zu. Im Bereich der Rayleigh-Streuer, die ein isotropes Streuverhalten zeigen, gilt z.B., dass die Streulichtintensität eines Teilchens proportional zu seinem Durchmesser hoch Sechszunimmt ($I \sim d^6$). Diese Abhängigkeit ist für größere Streuer (außerhalb des Rayleigh-Bereichs) etwas abgeschwächt, zeigt aber, dass ein Partikel mit einem Durchmesser von 1000 nm ungefähr die millionenfache Streuintensität eines 100 nm Partikels besitzt. Für die in Abbildung 7.1 dargestellte Partikelgrößenverteilung bedeutet das, dass die Anzahl an 100 nm Partikeln, trotz deutlich geringerer Intensität, viel größer ist als die Anzahl der 1000 nm Partikel. Darüber hinaus ist der Peak im Mikrometerbereich von der Partikelzahl gesehen nahezu zu vernachlässigen.

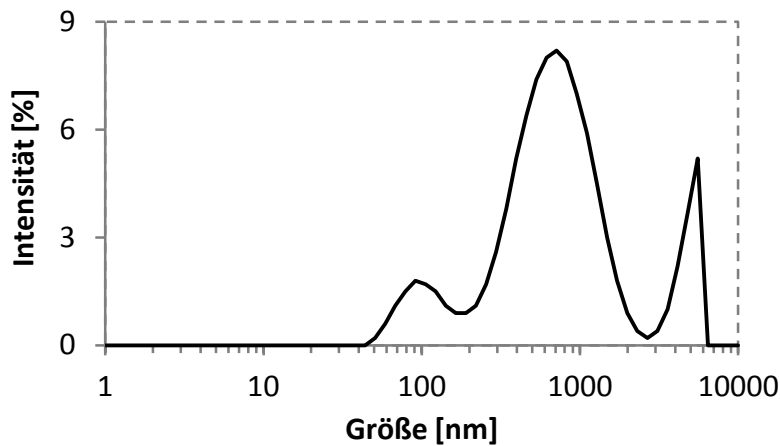


Abbildung 7.1: Darstellung der Partikelgrößenverteilung einer Probe mit einem hohen Polydispersitätsindex.

Die Abhängigkeit der Streulichtintensität von der Partikelgröße verdeutlicht auch einen großen Nachteil der Methode der dynamischen Lichtstreuung. In polydispersen Proben ist die Analyse von kleinen Partikeln neben großen Partikeln nur sehr schwer durchzuführen. Im Extremfall werden die kleinen Partikel sogar komplett vom Streusignal der großen Partikel überdeckt und können nicht detektiert werden. Diese Eigenschaft der dynamischen Lichtstreuung bietet jedoch auch einen Vorteil, denn einzelne große Partikel können sehr genau neben einer Population kleiner Partikel detektiert werden (z.B. Proteinaggregation in Proteinlösungen).

In diesem Abschnitt wird die dynamische Lichtstreuung, häufig auch Photonenkorrelationsspektroskopie genannt, anhand des in dieser Arbeit verwendeten Geräts, Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS, erläutert. Grundsätzlich dient die DLS zur Analyse von Partikelcharakteristika wie der Partikelgröße. Mit dem Zetasizer Nano ZS ist darüber hinaus die Bestimmung der Oberflächenladung, des Zetapotentials, von Partikeln möglich. Diese beiden Messmethoden zur Charakterisierung von kolloidalen Dispersionen und der Aufbau des Zetasizers werden im Folgenden vorgestellt.

7.1.1 Aufbau: Zetasizer Nano ZS^[117]

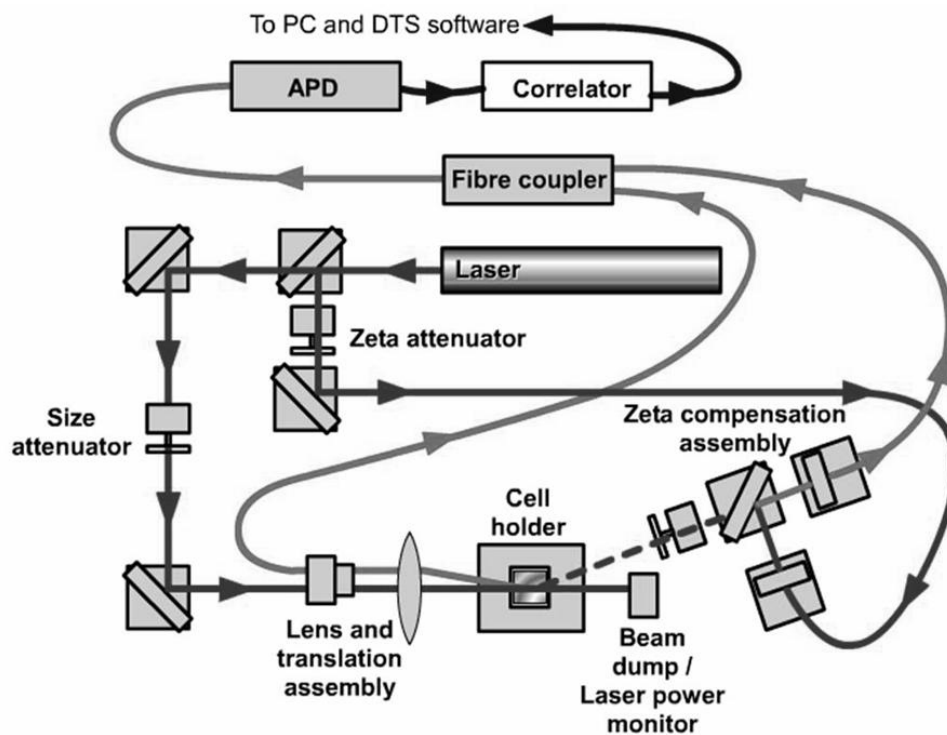


Abbildung 7.2: Optikschemata des Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS.^[117]

Der schematische Aufbau des Zetasizer Nano ZS ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Im Folgenden wird der Strahlengang für eine Partikelgrößenmessung vorgestellt: Der Primärlichtstrahl eines 633 nm He-Ne-Lasers (max. 4 mW) wird über den optischen Aufbau durch einen Intensitätsregler (size attenuator) in die Messzelle geleitet. Aus der Messzelle kann das an den Partikeln gestreute Licht mittels Rückstreutechnik bei 173 ° oder Vorwärtstreutechnik bei 13 ° detektiert und an den Detektor (APD: Avalanche-Photodiode) weitergeleitet werden. Die erhaltenen Streusignale werden anschließend über eine Autokorrelation durch einen Korrelator analysiert und an den Computer übermittelt.

- Intensitätsregler: Die Aufgabe des Intensitätsreglers besteht darin, die Intensität des Lasers so einzustellen, dass es durch das Streulicht am APD nicht zu einer Detektorübersättigung (zu hohe Intensität) oder der Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses kommt (zu niedrige Intensität).
- Rückstreudetektion: Die Messung über Rückstreudetektion ist eine moderne Methode, die es ermöglicht nahe am Mehrfachstreuminimum von 180 ° zu arbeiten. Dies ist wichtig, da die gemessene Geschwindigkeitsinformation nur im Falle von einfach gestreutem Licht unverfälscht ist.

7.1.2 Partikelgröße via DLS^[117]

Grundlage der Partikelgrößenmessung mittels DLS ist die Brown'sche Bewegung der zu messenden Partikel, die aus stochastisch verteilten Zusammenstößen zwischen den Partikeln und den Lösungsmittelmolekülen resultiert. Der Sachverhalt, dass kleine Partikel sich aufgrund der Zusammenstöße in Lösung schneller bewegen als große Partikel, wird für die Partikelgrößenbestimmung genutzt.

Wie in Abbildung 7.2 dargestellt, wird die reine Streulichtintensität über den APD detektiert. Da die Streulichtintensität in sehr kurzen Zeitintervallen (Mikrosekundenbereich) gemessen wird, können Intensitätsschwankungen, die aus der Brown'schen Bewegung der Partikel resultieren, nachvollzogen werden. Die gemessenen Intensitätsfluktuationen werden durch Interferenzen des Partikelstreulichts verursacht, da es aufgrund der großen Partikelzahl in einer Probe und deren ständiger Bewegung zu Verschiebungen des Streulichts zueinander kommt und somit Effekte wie die verstärkende oder auslöschende Interferenz der Streulichtwellen beobachtet werden können. Gemäß Abbildung 7.3 wird im Falle kleiner Partikel dementsprechend eine schnellere Intensitätsfluktuation im Vergleich zu größeren Partikeln detektiert, da sich die kleinen Partikel schneller bewegen.

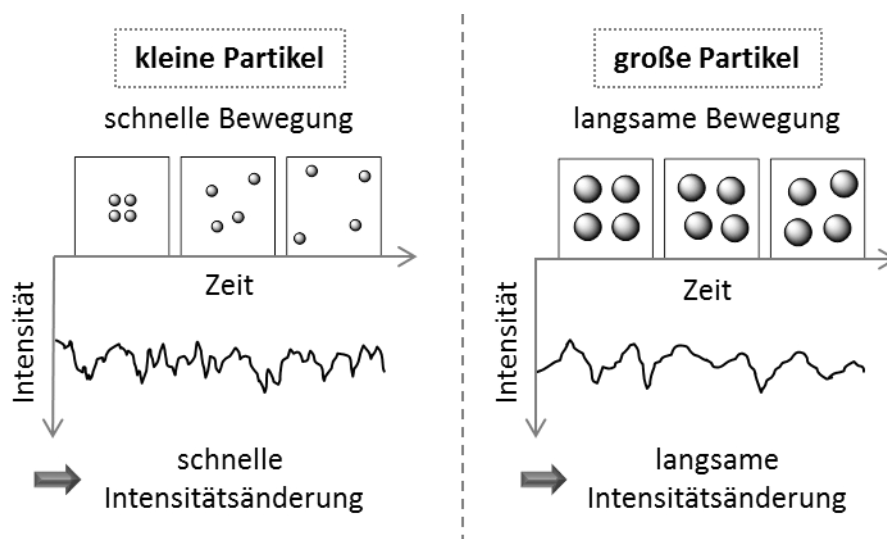


Abbildung 7.3: Darstellung der Partikeldiffusion und Intensitätsaufzeichnung während einer dynamischen Lichtstreuungsmessung.

Die so erhaltene Geschwindigkeit der Intensitätsfluktuation kann über Korrelation der Intensitäten zueinander auf die Brown'sche Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen zurückgeführt werden und liefert ein beispielhaft in Abbildung 7.4 dargestelltes Autokorrelogramm. Das Autokorrelogramm gibt Auskunft über wesentliche Faktoren, wie den

Polydispersitätsindex (2) und den Partikeldurchmesser (1), und erlaubt Rückschlüsse auf die Qualität einer Messung. So können z.B. späte Ausschläge in der Basislinie (3) auf die Anwesenheit von Staub oder Partikelaggregaten hindeuten.

- Polydispersitätsindex (PDI): Der Polydispersitätsindex ist ein Maß für die Verteilungsbreite der Partikelgröße einer gemessenen Probe und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Hierbei steht 0 für eine monodisperse, sehr enge Verteilung und 1 für eine polydisperse, breite Verteilung. Zur genauen Berechnung des PDI wird hier auf die Literatur verwiesen.^[117]

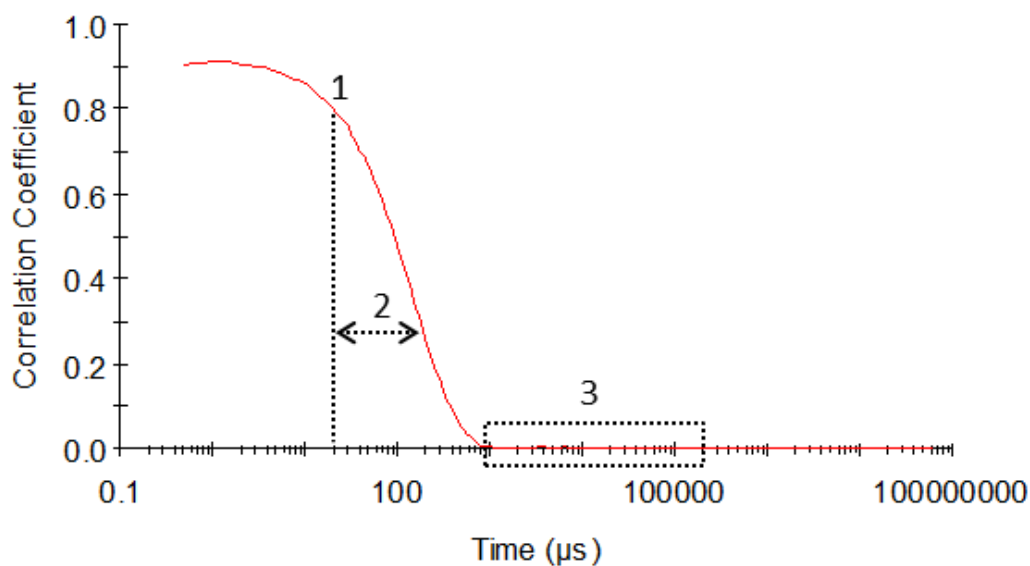


Abbildung 7.4: Beispielhaftes Autokorrelogramm, (1) Start der Korrelationsabnahme gibt Informationen über den Partikeldurchmesser, (2) Winkel des Korrelationsabfalls gibt Informationen über den Polydispersitätsindex, (3) Ausschläge in der Basislinie weisen auf Staub oder Partikelaggregate hin.

Mathematisch wird die zeitabhängig gemessene Intensitätsfluktuation über die in Gleichung 7.1 gegebene Autokorrelationsfunktion ausgewertet und liefert den translatorischen Diffusionskoeffizienten (D).

Gleichung 7.1

$$g(\tau) = e^{-Dq^2\tau}$$

mit q dem Streulichtvektor, D dem Diffusionskoeffizienten und τ der Messzeit. Der translatorische Diffusionskoeffizient beschreibt die Geschwindigkeit der Brown'schen Bewegung der Partikel und wird hauptsächlich von der Temperatur beeinflusst. Um den Diffusionskoeffizienten möglichst genau bestimmen zu können, ist folglich die Kenntnis der exakten Temperatur erforderlich, da sich diese auf die Viskosität der verwendeten Flüssigkeit

auswirkt und somit den Diffusionswiderstand beeinflusst. Darüber hinaus sollten folgende Effekte während einer Messung vermieden werden: Konvektion, Sedimentation, Flotation und Vibration. All diese Effekte führen zu einer gerichteten Bewegung der Partikel und verfälschen die Brown'sche Bewegung.

Der gemessene translatorische Diffusionskoeffizient kann abschließend über die Stokes-Einstein-Gleichung, Gleichung 7.2, zur Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers $d(h)$ der Partikel verwendet werden.

Gleichung 7.2
$$d(h) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

In Gleichung 7.2 steht k für die Boltzmannkonstante, η für die Viskosität des Lösungsmittels und T für die Temperatur. Bei der Berechnung ist jedoch zu beachten, dass der erhaltene hydrodynamische Durchmesser dem einer Kugel entspricht, die den gleichen Diffusionskoeffizienten besitzt, wie das zu charakterisierende Teilchen. Demzufolge liefert die DLS nur für sphärische Systeme exakte Ergebnisse und sollte für andere Morphologien als Näherung verwendet werden.

7.1.3 Zetapotential via DLS^[117]

Das Zetapotential steht mit der Nettooberflächenladung des Teilchens in Verbindung und kann genau wie die Partikelgröße in wässriger Suspension mittels DLS bestimmt werden. Zum Verständnis soll zu Beginn der Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht, die sich aufgrund der Nettoüberschussladung um ein geladenes Teilchen in Wasser ausbildet, siehe Abbildung 7.5, besprochen werden: Der innere Teil der Schicht, um das in diesem Beispiel positiv geladene Teilchen, heißt Sternschicht und wird von dehydratisierten und hydratisierten Anionen ausgebildet. Die Sternschicht setzt sich aus der inneren und der äußeren Helmholtz-Schicht zusammen und wird als fest fixierte Schicht um das Teilchen betrachtet. Da die Partikelladung durch die Sternschicht nicht vollständig kompensiert wird, bildet sich um die Sternschicht herum eine weitere Schicht aus, die sogenannte diffuse Schicht. In der diffusen Schicht lagern sich weiterhin hydratisierte Anionen und nun auch hydratisierte Kationen an, die aber weniger fest assoziiert sind. In dieser Schicht befindet sich, wie in Abbildung 7.5 gezeigt, die elektrokinetische Scherebene.

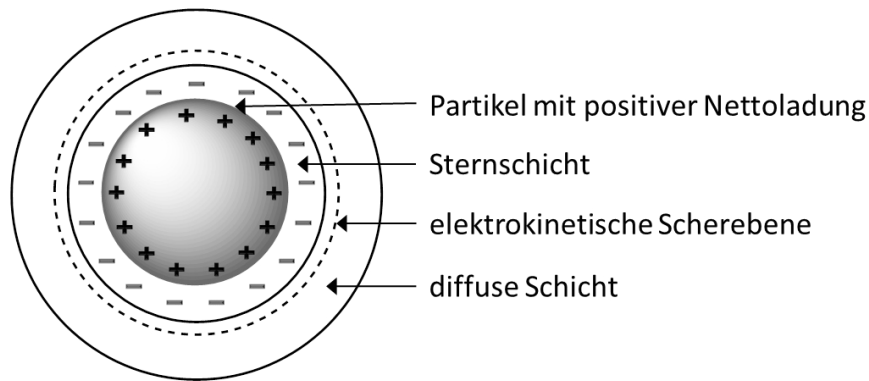


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht eines geladenen Partikels in einer Flüssigkeit.

Die Scherebene bildet die Grenze zwischen dem Teil der elektrochemischen Doppelschicht, der bei Bewegung mit dem Partikel wandert und dem, der abgeschert wird. Das Potential, das sich an dieser Scherebene zwischen den mit dem Partikel bewegten Ionen und den Ionen der Flüssigkeit ausbildet, wird Zetapotential genannt. Über das Zetapotential lässt sich nicht nur die Oberflächenladung von kolloidalen Systemen bestimmen, sondern es sind auch Rückschlüsse auf deren Stabilität möglich. So wird z.B. angenommen, dass ein kolloidales System ab einem absoluten Oberflächenladungsbetrag von ± 30 mV als stabil angesehen werden kann. Aufgrund ausreichender elektrostatischer Stabilisierung ist in diesem Fall die interpartikuläre Abstoßung groß genug, um eine Annäherung von Teilchen über van der Waals Kräfte und somit eine Flokkulation oder Koagulation zu verhindern.

Strahlengang Zetapotentialmessung

Für die Messung des Zetapotentials mittels DLS im Zetasizer Nano ZS ist der Strahlengang komplizierter als für die reine Partikelgrößenbestimmung, siehe Abbildung 7.2. Der Primärlichtstrahl wird zu Beginn in den Streulichtstrahl und den Referenzstrahl aufgeteilt. Der Streulichtstrahl läuft, wie bereits in Kapitel 7.1.1 beschrieben, über den Intensitätsregler in die Messzelle und wird dort von der Probe gestreut. Die Detektionsoptik ist jedoch in Vorwärtsrichtung in einem Streuwinkel von 13° angeordnet. Der Referenzstrahl wird über einen separaten Intensitätsregler an der Messzelle vorbeigeführt und wird mit dem Streustrahl, nachdem dieser die Probe passiert hat, im „zeta compensation assembly“ über einen externen, lokalen Oszillator gemischt. Der kombinierte Strahl wird zum APD weitergeleitet und abschließend vom Korrelator an den PC übermittelt.

Messprinzip

Um messtechnisch Informationen über die Ladungsverhältnisse an der Partikeloberfläche (das Nernst-Potential) zu erhalten, werden elektrokinetische Prozesse verwendet. In der Praxis haben sich für kolloidale Systeme, die auch in dieser Arbeit betrachtet werden, elektrophoretische Techniken zur Zetapotentialbestimmung durchgesetzt. Im Zetasizer Nano ZS wird die Methode der Laser-Doppler-Elektrophorese eingesetzt.

Im Mittelpunkt der elektrophoretischen Messung des Zetapotentials steht die Ableitung des Zetapotentials aus der elektrophoretischen Mobilität, die wiederum aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Teilchen ermittelt werden kann. Die Laser-Doppler-Elektrophorese bedient sich zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens in einem elektrischen Feld des Doppler-Effekts. Der Doppler-Effekt beschreibt das Phänomen, dass bewegte Objekte bei der Streuung von Licht eine Frequenzverschiebung hervorrufen. Die Frequenzverschiebung liegt für die Partikelwanderung im elektrischen Feld bei ca. 100 Hz. Da die Frequenz des Primärstrahls jedoch bei ca. $6 \cdot 10^{14}$ Hz liegt, ist die direkte Messung der Frequenzverschiebung nicht realisierbar. Um die Frequenzverschiebung und somit die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmen zu können, wird das Verfahren des „optical mixing“ eingesetzt. Dazu wird ein Paar kohärenter Laserstrahlen erzeugt, wobei einer der Strahlen durch die Probe geleitet und anschließend mit dem Referenzstrahl kombiniert wird. Die Kombination der beiden Strahlen führt über konstruktive und destruktive Interferenz zu einem niederfrequenten Überlagerungsstrahl, der mathematisch genau der Frequenzverschiebung des Streulichtes entspricht. Über Gleichung 7.3 lässt sich aus der Frequenzverschiebung die Wanderungsgeschwindigkeit als einzige Unbekannte bestimmen.

Gleichung 7.3

$$v = \frac{\lambda \Delta \nu}{2n \sin(\theta/2)}$$

mit v – Wanderungsgeschwindigkeit, $\Delta \nu$ – Frequenzverschiebung, n – Brechungsindex und θ – Detektionswinkel. Durch die Division der Wanderungsgeschwindigkeit durch die elektrische Feldstärke (E) kann die in Gleichung 7.4 dargestellte elektrophoretische Mobilität (μ_e) berechnet werden.

Gleichung 7.4

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \eta}$$

mit q – Ladung, r – Radius und η – Viskosität. Über die elektrophoretische Mobilität wird letztendlich das Zetapotential (ζ) erhalten. Eine stark vereinfachte Berechnungsform für das Zetapotential eines kugelförmigen Teilchens (Gleichung 7.6) ergibt sich, wenn Gleichung 7.5 (Zusammenhang von Ladung (q) und dem Potential an der Oberfläche (ζ) eines kugelförmigen Teilchens) in Gleichung 7.4 (elektrophoretische Mobilität) eingesetzt wird.

Gleichung 7.5

$$q = 4\pi r \varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta$$

mit ε_0 – absolute und ε_r – relative Dielektrizitätskonstante des Mediums.

Gleichung 7.6

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_e}{2\varepsilon_0\varepsilon_r}$$

Für eine exaktere Bestimmung des Zetapotentials müssen neben den zuvor bereits berücksichtigten Kräften des elektrischen Feldes und der Stokes'schen Reibung (diese ergeben sich zu μ_e) auch noch die elektrophoretische Retardation und der Relaxationseffekt mit einbezogen werden. Dies führt zu komplexeren Berechnungen für die auf die Literatur verwiesen wird. ^[117]

Durchführung und Messzelle

Zur praktischen Durchführung wird die zu vermessende Probe in eine Kapillarmesszelle, siehe Abbildung 7.6, gegeben. Über zwei Kontakte wird vom Zetasizer ein definiertes, elektrisches Wechselfeld an die Probe angelegt. Dies induziert eine ladungsabhängige „Wanderung“ der Partikel. Die Lichtstreuung wird dabei im unten gelegenen Bogen der Messzelle durchgeführt.

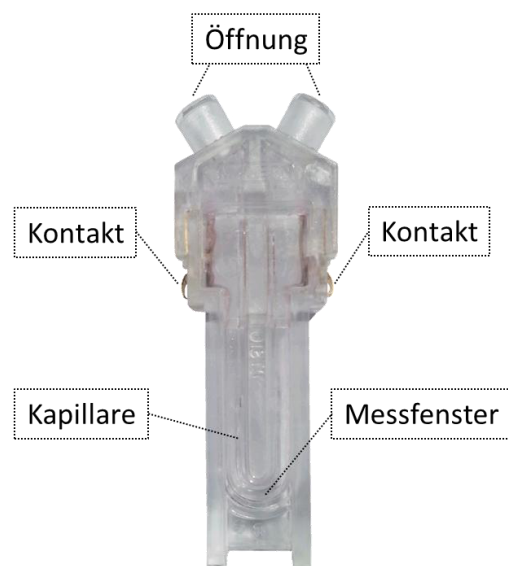


Abbildung 7.6: Kapillarmesszelle für den Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS.

7.2 Ellipsometrie^[131,132]

In diesem Kapitel wird eine Einführung in die Analytikmethode Ellipsometrie gegeben, um die Funktionsweise kurz und übersichtlich darzustellen. Für die Betrachtung der komplexen mathematischen und physikalischen Hintergründe wird auf die Literatur verwiesen.^[131,132]

Die Ellipsometrie ist ein optisches Analytikverfahren, das zur Charakterisierung von dünnen Filmen auf reflektierenden Oberflächen eingesetzt wird. Der Messung liegt zugrunde, dass die Reflektion von Licht an einer Oberfläche eine Änderung der Polarisierung des Lichtes zur Folge hat. Diese Polarisationsänderung kann detektiert werden und erlaubt Rückschlüsse auf optische Eigenschaften, wie Brechungsindex und Extinktionskoeffizient, der untersuchten Oberfläche. Darüber hinaus kann über die Polarisationsänderung eine Schichtdickenbestimmung im Nanometerbereich durchgeführt werden.

7.2.1 Aufbau und Messprinzip

Licht ist eine elektromagnetische Transversalwelle und setzt sich aus zwei senkrecht zueinander verlaufenden Wellen, dem elektrischen und dem magnetischen Feldvektor, zusammen. Die Reflektion von Licht an Oberflächen spielt in der Ellipsometrie eine zentrale Rolle und wird im Folgenden kurz dargestellt: Trifft Licht, wie in Abbildung 7.7 gezeigt, auf eine Oberfläche, wird es in einen reflektierten und einen transmittierten Teil aufgeteilt. Die Reflektion findet hierbei im Einfallswinkel des eintreffenden Lichtstrahls statt. Der Teil, der in die Probe eintritt, wird nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz in Abhängigkeit vom Brechungsindex von Medium 2 gebrochen und kann an der nächsten Mediengrenze erneut gebrochen und reflektiert werden.

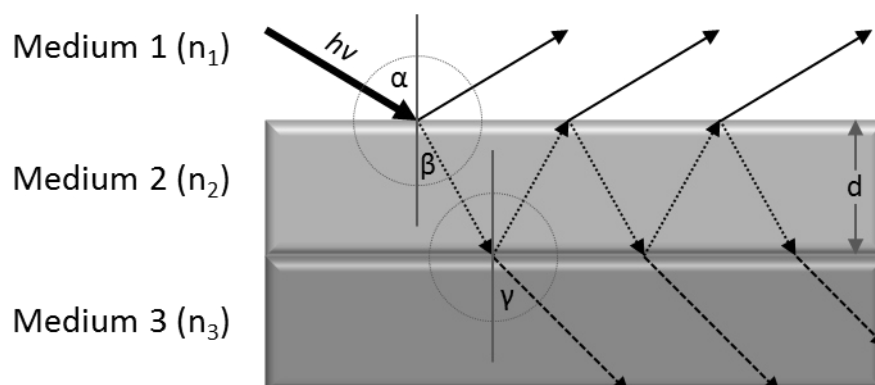


Abbildung 7.7: Reflexion und Brechung von Licht an den Grenzflächen verschiedener Medien.

Wird linear polarisiertes Licht an der Grenzfläche zwischen Medium 1 und 2 transmittiert und reflektiert, entsteht eine Phasenverschiebung der parallel und senkrecht zur Eintrittsebene verlaufenden Lichtkomponenten zueinander. Die Phasenverschiebung ist auf die zusätzliche Weglänge, die der transmittierte Teil des Lichts in Medium 2 zurücklegen muss bevor er wieder in Medium 1 austritt, zurückzuführen. Somit kann eine Änderung des Polarisationszustandes des reflektierten Lichts erfolgen, da die beiden Komponenten des zuvor linear polarisierten Lichts nun phasenverschoben zueinander sind. Der Spezialfall einer Phasendifferenz von $\pi/2$ (oder $\lambda/4$) führt zu zirkular polarisiertem Licht, in allen anderen Fällen ergibt sich elliptisch polarisiertes Licht nach der Reflektion. Der Grad der induzierten Elliptizität hängt hierbei von den optischen Eigenschaften der Probe, also des Substrats und der Dicke von vorhandenen Filmen/Beschichtungen auf der Oberfläche, ab.

Im Ellipsometer wird das zuvor beschriebene Phänomen der Polarisationsänderung nach Reflektion an einer Oberfläche umgekehrt zum Einsatz gebracht. Hier wird aus elliptisch polarisiertem Licht über die Reflektion an der zu untersuchenden Probe linear polarisiertes Licht erzeugt. In Abbildung 7.8 ist der typische Aufbau eines Ellipsometers gezeigt. Die wichtigsten Bestandteile eines solchen Systems sind die Lichtquelle (in dieser Arbeit ein 532 nm Nd-YAG-Laser), der Polarisator, eine $\lambda/4$ -Platte (Kompensator), die Probe, ein Analysator und ein Detektor. Anhand dieses Aufbaus wird im Folgenden die häufig verwendete Methode der Nullellipsometrie erläutert.

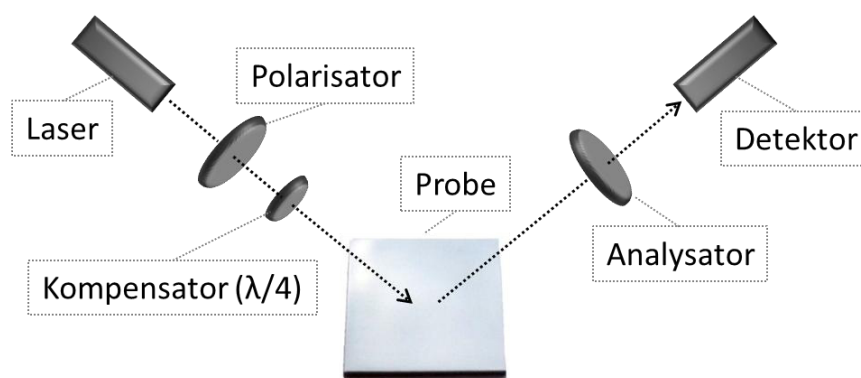


Abbildung 7.8: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.

Der zur Untersuchung der Probe verwendete Laserstrahl wird in den meisten Fällen durch einen He-Ne-Laser oder einen Nd-YAG-Laser erzeugt. Das monochromatische Licht des Lasers wird zu Beginn im Polarisator linear polarisiert und von dort zum Kompensator geführt.

Der Kompensator ist ein anisotropes optisches Element, das in einem Winkel von 45° zur Lichtwelle steht und über eine schnelle und eine langsame orthogonal zueinander stehende Durchtrittsachse (resultiert in Phasenverschiebung) die elliptische Polarisierung des Laserstrahls ermöglicht. Wird das elliptisch polarisierte Licht an der Oberfläche der Probe reflektiert, so verändert sich erneut der Polarisationszustand. Über die Einstellung des Polarisators kann die elliptische Polarisierung des Laserstrahls so eingestellt werden, dass nach der Reflexion an der Oberfläche der Probe wieder linear polarisiertes Licht vorliegt. Das so erhaltene, linear polarisierte Licht kann vom Analysator ausgelöscht werden und führt zu einer Intensität von Null am Detektor (Nullellipsometrie). In der Praxis werden Polarisator und Analysator bis zur Intensitätsauslöschung am Detektor (meist Photomultiplier) gegeneinander rotiert. Dies liefert die beiden Messgrößen Δ und Ψ , die Informationen über die optischen Eigenschaften der Probe enthalten und zur Auswertung herangezogen werden.

7.2.2 Messgrößen

Die durch eine ellipsometrische Messung erhaltenen Größen Δ und Ψ ermöglichen die Bestimmung von Brechungsindex und Extinktionskoeffizient des betrachteten Substrates. Des Weiteren können sie über ein der Probe angepasstes Modellsystem zur Berechnung von Schichtdicken und komplexen Brechungsindices von Filmen auf dem Substrat verwendet werden. Hierbei ist jedoch deutlich hervorzuheben, dass mit dem Ellipsometer lediglich Δ und Ψ und nicht die Schichtdicke an sich bestimmt werden. Darüber hinaus wird über das angenommene Modell immer nur das Produkt aus Brechungsindex und Schichtdicke für die betrachtete Beschichtung berechnet. Aus diesem Grund sind die Wahl des richtigen Schichtmodells und die ungefähre Kenntnis des Brechungsindexess essentiell für die Verlässlichkeit der ermittelten Schichtdicken. Für weiterführende Informationen wird auf die Fachliteratur verwiesen.^[131]

7.3 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie^[133]

Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) ist eine Methode zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung von Oberflächen. Der Einsatz von XPS liefert qualitative und quantitative Aussagen über alle an der Oberfläche vorhandenen Elemente, mit Ausnahme von Wasserstoff und Helium, ab einem atomaren Anteil über 0,1 %. Analysiert werden hierbei ungefähr die äußersten 10 nm der untersuchten Probe, dadurch ist diese Methode oberflächensensitiv. Neben der atomaren Zusammensetzung der Oberfläche ermöglicht XPS auch

die Aufklärung von Bindungsverhältnissen und kann Informationen über die Anordnung und Morphologie einer Oberfläche liefern. Im Folgenden wird nur eine kurze Übersicht über die Methode gegeben. Für weiterführende Information wird auf die Literatur verwiesen.^[133]

7.3.1 Aufbau und Messprinzip^[133]

Der beispielhafte Aufbau für ein XPS-Spektrometer ist in Abbildung 7.10 dargestellt. Um eine XPS-Messung durchzuführen, wird die zu vermessende Probe in eine Vakuumkammer eingebracht. Zur Erzeugung der verwendeten Röntgenstrahlung wird ein Elektronenstrahl mit ca. 10 keV auf die Anode, hier eine Aluminiumfolie, gerichtet. Der hochenergetische Elektronenstrahl ist in der Lage seine Energie auf kernnahe Elektronen der Aluminiumatome in der Anode zu übertragen. Dies hat die Emission von Photoelektronen aus der Anodenoberfläche zur Folge und resultiert in der Ausbildung von „Kernlöchern“, siehe Abbildung 7.9.

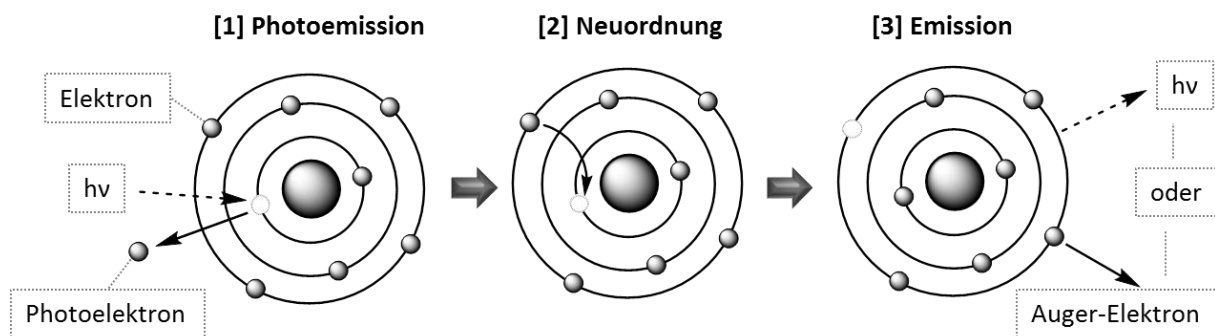


Abbildung 7.9: Schematische Darstellung der [1] Photoemission mit anschließender [2] Neuordnung der Elektronen und der darüber freigesetzten [3] Röntgenfluoreszenz nach Bestrahlung eines Atoms mit hochenergetischen Photonen.

Die Aluminiumatome der Anode können auf ihren $(n-1)$ -Elektronenzustand reagieren, indem sie ein äußeres Elektron in das Kernloch umlagern. Dieser Prozess setzt wiederum die überschüssige Energie des relokalierten Elektrons in Form eines Röntgenphotons (Röntgenfluoreszenz) oder eines Auger-Elektrons (ein weiteres außen gelegenes Elektron) frei. Für die XPS-Spektroskopie wird die Röntgenfluoreszenz aufgrund ihrer geringen Emissionsbreite und definierten Energie verwendet. Im Falle von Aluminium wird die Röntgenfluoreszenz mit einer Energie von 1486,6 eV und einer Breite von 0,85 eV emittiert. Wie in Abbildung 7.10 dargestellt, wird die Röntgenfluoreszenz von einem Quarzkristall monochromatisiert und auf die zu untersuchende Probe geleitet.

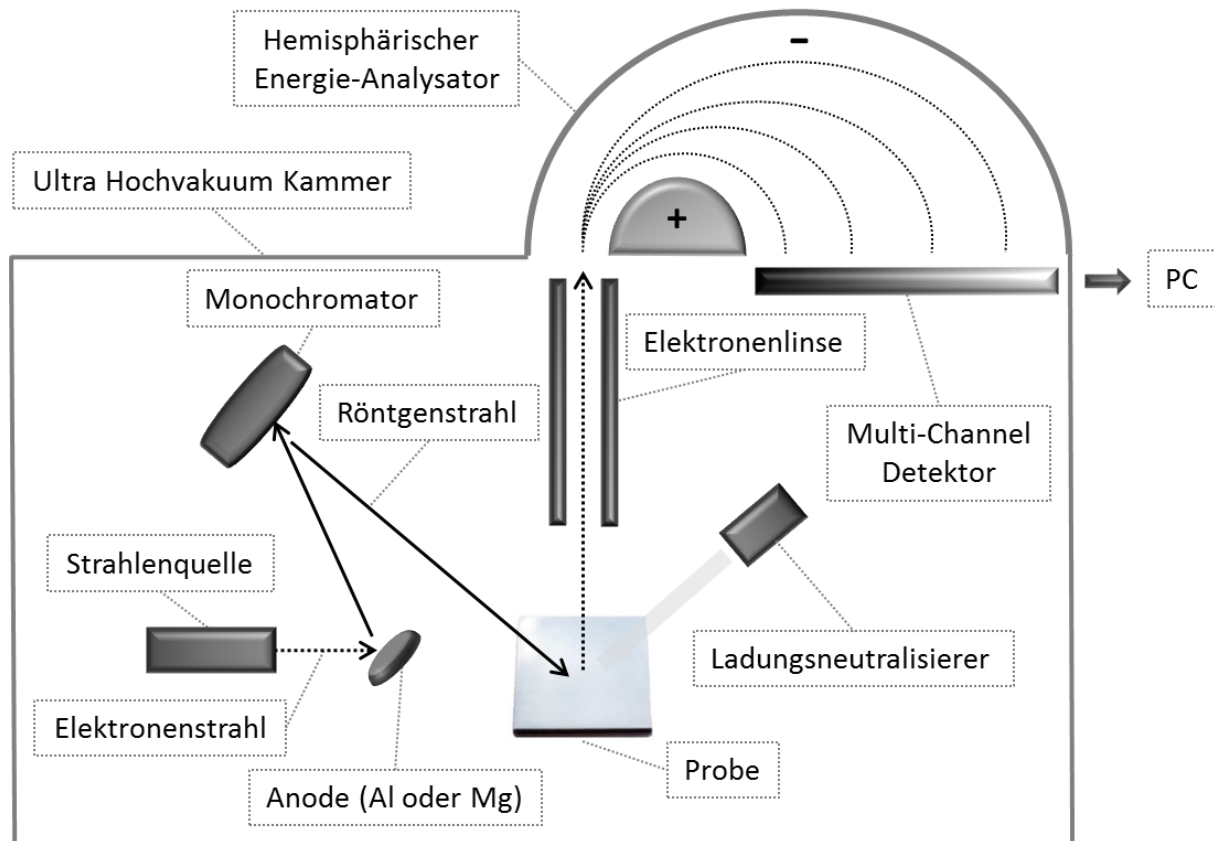


Abbildung 7.10: Schematischer Aufbau eines XPS-Spektrometers.

An der Oberfläche der Probe läuft der bereits in Abbildung 7.9 gezeigte Prozess der Photoelektronenemission erneut ab. Die aus der Oberfläche gelösten Photoelektronen werden durch eine Elektronenlinse gesammelt, abgebremst und in den hemisphärischen Energie-Analysator geführt. Das Abbremsen im Linsensystem auf die „Passierenergie“ des Analysators senkt die kinetische Energie der Photoelektronen, sodass Zusammenstöße mit der Wand des Analysators vermieden werden. Der hemisphärische Analysator besteht aus zwei konzentrischen Hemisphären, an die ein Potential angelegt wird. In Bezug auf die mittlere Durchlaufbahn des Analysators ist die äußere Wand negativ und die innere positiv geladen. Die mittlere Durchlaufbahn entspricht hierbei der Passierenergie, auf die die Photoelektronen zuvor abgebremst wurden. Da die Photoelektronen je nach Herkunftsort unterschiedliche Energien tragen, werden sie durch das elektrische Feld des Analysators auf verschiedene Bahnen abgelenkt. Somit werden die Photoelektronen ihrer Energie nach „sortiert“ und treffen abhängig von ihrer Energie an verschiedenen Stellen auf den Multi-Channel Detektor. Dies ermöglicht es dem Detektor energieaufgelöst die Anzahl an auftreffenden Photoelektronen zu zählen. Letztendlich kann über die einzelnen detektierten Energien auf die atomare und molekulare Umgebung der Photoelektronen zurückgeschlossen werden, da die für jedes

Element spezifische Bindungsenergie (E_B) eines Elektrons über Gleichung 7.7 berechnet werden kann.

Gleichung 7.7
$$E_B = h\nu - E_{kin}$$

mit $h\nu$ – Energie der Röntgenfluoreszenz (bekannt) und E_{kin} – kinetische Energie der Photoelektronen (wird gemessen). Das Zählen der Photoelektronen am Detektor bietet darüber hinaus Informationen über die Konzentration des jeweiligen Atoms an der Probenoberfläche.

In Fällen, in denen nicht leitende Proben untersucht werden, wie in dieser Arbeit, wird neben dem bereits besprochenen Aufbau noch ein Ladungsneutralisierer benötigt, da nicht leitende Proben die durch die Emission von Photoelektronen aufgebaute positive Ladung nicht eigenständig kompensieren können. Dies hätte eine Verfälschung der erhaltenen Spektren zur Folge und wird durch einen niederenergetischen Elektronenstrom des Ladungsneutralisierers verhindert. In Gleichung 7.7 muss dementsprechend die Energie der Neutralisierungselektronen (ϕ_e) mit einbezogen werden, siehe Gleichung 7.8.

Gleichung 7.8
$$E_B^{vac} = h\nu - E_{kin} + \phi_e$$

Unter Verwendung eines probeninternen Referenzpeaks, C-C oder C-H für Polymere und organische Proben, ist die genaue Bestimmung der Bindungsenergie auch für nicht leitende Proben möglich.

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien

Tabelle 8.1: Chemikalien

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller
Albumin aus Rinderserum (BSA)	-	Roche
Butan-2-ol	99 %	Sigma-Aldrich
Chitosan (190-310 kDa, 15-25 % DA)	-	Sigma-Aldrich
Chitosan (60-120 kDa, ultrapure)	-	Sigma-Aldrich
Deuteriumchlorid (36-38 % in D ₂ O)	99,5 %	deutero
Deuteriumoxid	99,8 %	deutero
Diethylchlorophosphat	97 %	Sigma-Aldrich
Essigsäure	100 %	Sigma-Aldrich
Essigsäure (d ₄ -deutert)	99,9 %	Sigma-Aldrich
Essigsäureanhydrid	99 %	Sigma-Aldrich
Lysozym (chicken egg white)	-	Serva
Methansulfonsäure	99,5 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	99,5 %	Roth
Natriumhydroxid	99 %	Roth
Natriumthymidintriposphat	96 %	Sigma-Aldrich
Natriumtripolyphosphat	98 %	Sigma-Aldrich
Phosphorpentoxid	99 %	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	85 %	Alfa-Aesar
Phosphatpuffer Pellets (pH 7,4)	-	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin (1,6 kDa)	90-100 %	Alamanda Polymers
rhBMP-2 (from <i>E. coli</i>) ³⁶	-	HZI ³⁷
Thymidin-Pentamer (5'-T-T-T-T-T-3')	-	Eurofins MWG Operon
Triethylphosphat	99,8 %	Sigma-Aldrich

³⁶ Recombinant human bone morphogenetic protein 2

³⁷ Hergestellt in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Gerhard Gross am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig

Tabelle 8.2: Lösungsmittel

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller
Aceton	HPLC, 100 %	VWR
Dichlormethan	HPLC, 99,8 %	VWR
Ethanol	destilliert	-
Methanol	HPLC, 100 %	VWR
Wasser	dest., Millipore	-

8.1.1 Titansubstrate

Für alle durchgeführten Beschichtungsversuche wurden Titansubstrate, ca. 1 mm dick von GOODFELLOW, bestehend aus Ti6Al4V in einer Größe von 1x1 cm² verwendet.

8.2 Polymercharakterisierung

8.2.1 NMR

Alle NMR-Messungen wurden vom NMR-Labor der organischen Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. ¹H-NMRs und ³¹P-NMRs wurden über ein DRX 400 oder ein AV-III 400 Spektrometer von BRUKER mit einer magnetischen Feldstärke von 9.4 T aufgenommen. D₂O, DCl und CD₃COOD wurden als deuterierte Lösemittel eingesetzt.

8.2.2 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden vom analytischen Labor des Instituts für medizinische und pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Als Messgerät kam hierbei ein EA 1112 von THERMO QUEST ITALIA S.P.A. zum Einsatz.

8.3 Nanopartikelcharakterisierung

8.3.1 Partikelgröße und Zetapotential

Die Charakterisierung der in dieser Arbeit hergestellten Partikelsuspensionen erfolgte mit einem Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS. Zur Bestimmung der Partikelgröße wurden Einwegküvetten (DTS0012) und zur Bestimmung des Zetapotentials Einwegzetazellen (DTS1060C) verwendet. Neben den Partikeldegradationen bei 37 °C wurden alle Untersu-

chungen bei 20 °C durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mittels der MALVERN Zetasizer Software Version 6.32.

8.4 Beschichtungsmethode und -charakterisierung

8.4.1 Präparation der Titansubstrate

Die Titanplättchen wurden an einem Poliergerät der Firma Buehler des Typs Phoenix 4000 geschliffen und poliert. Anschließend wurden die Plättchen im Ultraschallbad für je 5 Minuten mit destilliertem Dichlormethan, Aceton, Methanol und abschließend mit Millipore Wasser gewaschen. Die gewaschenen Titansubstrate wurden daraufhin im Plasmareiniger gereinigt und am Ellipsometer zur Bestimmung der optischen Referenzeigenschaften vermessen.

8.4.2 Oberflächenmodifikation

Beschichtungen wurden über manuelle Sprühbeschichtung mit einer Airbrush A470 von AZTEK hergestellt. Hierfür wurde ein Aerosol für eine definierte Zeit, z.B. 3 Minuten, mit einem ungefähren Volumenstrom von 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf die Oberfläche der Titansubstrate aufgesprüht und anschließend in Millipore Wasser geschwenkt und getrocknet. Die Titanplättchen wurden dafür in einer Schieblehre eingespannt, sodass die komplette Oberfläche zum Beschichten zur Verfügung stand.

8.4.3 Ellipsometrie

Für ellipsometrische Messungen wurde ein Multiskop von OPTREL im Nullellipsometriemodus verwendet. Die Messungen wurden im x,y-Modus unter einem Winkel von 70 ° durchgeführt. Dabei wurde die Oberfläche jeder Probe gescannt und quadratisch mit 4x4 Messpunkten abgerastert. Über die erhaltenen 16 Messpunkte wurde zur Bestimmung von optischen Konstanten und Schichtdicken gemittelt. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Elli Software Version 3.2 von OPTREL vorgenommen.

8.4.4 REM

REM Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Peter Pfeiffer am Institut für Werkstoffe der TU Braunschweig an einem LEO 1550 von CARL ZEISS angefertigt. Für die Aufnahmen wurden die Titanplättchen mit Silberleitlack auf einem Träger fixiert.

8.4.5 XPS

XPS Messungen wurden von Wibke Dempwolf in Zusammenarbeit mit Hermann Götz und Prof. Heinz Duschner vom Institut für Angewandte Struktur- und Mikroanalytik in Mainz durchgeführt. Für die Messungen wurde ein PHI 6500ci von PHYSICAL ELECTRONICS mit einer monochromatisierten Al K α X-ray Quelle verwendet. Alle Spektren wurden unter einem take-off-angle von 0 ° aufgenommen. Die Auswertung wurde mit Hilfe der CasaXPS Software von CASA SOFTWARE LTD vorgenommen.

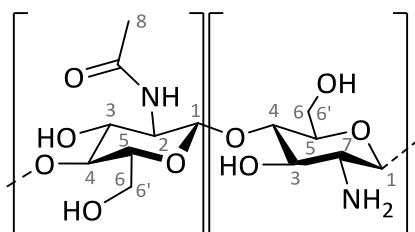
8.5 Kapitel 4.1 – CS(17)-TPP

8.5.1 Chitosan: Aufreinigung

Die Aufreinigung von Chitosan wurde nach einer Methode von GAN et al. durchgeführt.^[40] Hierfür wurde Chitosan (medium MW, 190-310 kDa, 15-25 % DA) in 1 M Natronlauge (1 g CS pro 10 mL NaOH) gegeben und bei 70 °C für 2 h gerührt. Anschließend wurde das Chitosan abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und in 1 %-iger AcOH gelöst. Die Chitosanlösung wurde erneut filtriert, gegen destilliertes Wasser dialysiert (10 kDa MW cutoff) und lyophilisiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-NMR in einer Mischung aus D₂O/DCl in einem Verhältnis von 500/1. Der Acetylierungsgrad (DA) wurde über ¹H-NMR auf 17 %, CS(17), berechnet.

$$DA = \frac{\text{Integral}(H_8) \times 2}{\text{Integral}(H_{2-6}) + \text{Integral}(H_7)}$$

¹H-NMR (D₂O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): 5,00-4,64 (m, HOD und 1 H₁); 4,14-3,42 (m, 5-6 H, H₂₋₇); 3,28-3,00 (s, 0-1 H, H₇); 2,15-1,95 (s, 3 H, H₈).



8.5.2 CS(17)-TPP: Nanopartikel

CS(17) wurde in 0,1 % oder 1 % (v/v) AcOH gelöst um eine 1 mg/mL Chitosanlösung zu erhalten. Nachdem sich das CS(17) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL TPP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durch wiederholtes Aufziehen und Entlee-

ren durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungsverhältnis bei 3:1 (CS:TPP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.5.3 CS(17)-TPP: pH-Titration

10 mL CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL) Nanopartikelsuspension wurden von pH 3,65 mittels 0,25 M NaOH auf pH 7,9 titriert. Die Nanopartikelsuspension wurde für die Messung in ein Plastiktube gegeben, das mit einem Autotitrator MPT-2 von MALVERN INSTRUMENTS verbunden wurde. An den Autotitrator waren eine Entgasungseinheit und der Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS angeschlossen. Die Titration erfolgte vollautomatisch über den Titrator. Die Lösung wurde über Zirkulation zwischen Titrator und Zetasizer in den vorgegebenen pH-Intervallen von 0,5 hinsichtlich Partikelgröße und Zetapotential charakterisiert.

8.5.4 CS(17)-TPP: Beschichtungen

Die Beschichtung von Titansubstraten mit einer CS(17)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,75 % AcOH) Nanopartikelsuspension erfolgte über eine 3-minütige Sprühbeschichtung (ca. 7 µL/min) der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2.

8.5.5 CS(17)-TPP: Beschichtungsstabilität

Die Beschichtung erfolgte wie in Kapitel 8.5.4 beschrieben. Jeweils 3 beschichteten Titanproben wurden in je 1 mL Millipore oder PBS in eine 24-Kammer-Mikrotiterplatte gelegt und bei 37 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden die Plättchen aus der Lösung entnommen, kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert, siehe Kapitel 8.4.3. Anschließend wurden die Titanplättchen jeweils in 1 mL frischem Medium bei 37 °C gelagert.

8.5.6 CS(17)-TPP: Degradation mit Lysozym

990 µL CS(17)-TPP Nanopartikelsuspension (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) wurden in eine Einwegküvette gegeben und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurden 10 µL einer Lysozymlösung hinzugegeben, um eine Lysozymkonzentration von 1,5 µg/mL zu erhalten. Der Degradationsprozess wurde über DLS mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C aufgezeichnet.

8.5.7 *In vitro*: CS(17)-TPP mit BSA

3 mL einer 1 mg/mL CS(17)-Lösung wurden bei pH 5,5 in einem Glaszentrifugenröhrchen mit 20 µL oder 40 µL einer 100 mg/mL BSA-Lösung in dest. Wasser gemischt. Anschließend wurde jeweils 1 mL 1 mg/mL TPP in Millipore über eine Eppendorfpipette eingemischt. Die Freisetzung von BSA wurde nach den experimentellen Angaben von GAN et al. durchgeführt.^[41] Die CS(17)-TPP-BSA Nanopartikel wurden nach der Bildung über Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000 rpm und 10 °C von der Mutterlösung getrennt. Die Überstände wurden abdekantiert und bis zur BSA Quantifizierung bei 4 °C gelagert. Die erhaltenen Nanopartikelpellets wurden durch Zugabe von 3 mL PBS resuspendiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden daraufhin verschlossen und bei 37 °C in einem Brutraum leicht geschüttelt. Nach 1 h, 3 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden jeweils Proben entnommen. Zur Quantifizierung der eingelagerten BSA-Menge (über den Überstand) und der freigesetzten BSA-Menge (über die entnommenen Proben) wurde ein Micro Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit (von Pierce) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

8.5.8 *In vitro*: CS(17)-TPP mit BMP-2

3 mL einer 1 mg/mL CS(17)-Lösung (0,2 % (v/v) AcOH in Millipore) wurden in einem Glaszentrifugenröhrchen mit 100 µL einer 2 mg/mL BMP-2-Lösung in MES Puffer (50 mM, pH 5) gemischt. Anschließend wurde 1 mL 1 mg/mL TPP in Millipore über eine Eppendorfpipette eingemischt und die Zentrifugenröhrchen für 30 Minuten geschüttelt. Die CS(17)-TPP-BMP-2 Nanopartikel wurden nach der Bildung über Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000 rpm und 21 °C von der Mutterlösung getrennt. Der Überstand wurde abdekantiert und bei -20 °C bis zur Quantifizierung gelagert. Die erhaltenen Nanopartikelpellets wurden durch Zugabe von 1 mL PBS resuspendiert und in 1,5 mL Eppendorftubes überführt. Diese wurden daraufhin verschlossen und bei 37 °C in einem Thermomixer mit 1100 rpm geschüttelt. Nach 45 Minuten wurden die Nanopartikel erneut über Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 rpm und 21 °C von der Lösung getrennt. Aus den Überständen wurden daraufhin jeweils 100 µL entnommen und bei 4 °C bis zur Quantifizierung gelagert. Die Pellets wurden wieder resuspendiert und die Nanopartikelsuspensionen wurden zurück in den Thermomixer gestellt. Dieser Vorgang wurde nach 4 h, 1 d, 2 d, 3 d und 7 d für weitere Probeentnahmen wiederholt. Zur Quantifizierung der eingelagerten BMP-2-Menge über den Überstand und der freigesetzten BMP-2-

Menge über die entnommenen Proben wurde ein BMP-2 sandwich ELISA nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

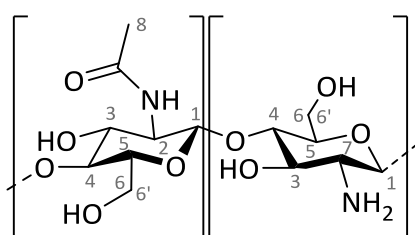
8.6 Kapitel 4.2 – CS(42)-TPP

8.6.1 Chitosan: Acetylierung

Die Acetylierung von Chitosan wurde nach eine Methode von FREIER et al. durchgeführt.^[45] Hierfür wurde aufgereinigtes Chitosan mit einem DA von 17 %, siehe Kapitel 8.5.1, in 1 % (v/v) AcOH zur Herstellung einer 5 mg/mL Chitosanlösung gelöst. Im Anschluss wurde das Volumen der Lösung durch Zugabe von dest. EtOH verdoppelt. Zu der Lösung wurde Essigsäureanhydrid in einem Molverhältnis von 0,32 (Essigsäureanhydrid zu Glucosamin) hinzuge tropft und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Das acetylierte Chitosan wurde anschließend mit dest. Wasser dialysiert (10 kDa MW cutoff), filtriert und lyophilisiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-NMR in einer Mischung aus D₂O/DCl in einem Verhältnis von 500/1. Der Acetylierungsgrad wurde über ¹H-NMR auf 42 %, CS(42), berechnet.

$$DA = \frac{Integral(H_8) \times 2}{Integral(H_{2-6}) + Integral(H_7)}$$

¹H-NMR (D₂O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): 4,99-4,69 (m, HOD und 1 H₁); 4,04-3,50 (m, 5-6 H, H₂₋₆); 3,27-3,08 (s, 0-1 H, H₇); 2,14-1,92 (s, 3 H, H₈).



8.6.2 Viskosimetrie – Degradation von CS(17) und CS(42) mit Lysozym

Viskositätsmessungen wurden mit einer DIN Ic und einer DIN Ilc Ubbelohde Kapillare in einem AVS 470 Viskosimeter von SCHOTT INSTRUMENTS in Kombination mit einem transparenten Thermostaten CT 72/P von SI ANALYTICS durchgeführt. Eine Übersicht über die eingesetzten Messlösungen ist in Tabelle 8.3 gegeben. Die Lösungen wurden jeweils vor der Messung auf 37 °C temperiert. In den meisten Fällen wurden der Lösung im Anschluss 1,5 µg Lysozym pro Milliliter Chitosanlösung hinzugefügt. Die Lösungen wurden gut durchmischt, in Kapillaren

gefüllt und nach kurzer Temperierung im vorgewärmten Thermostaten (37 °C) gemessen. Die Durchlaufzeit der Lösungen wurde über mehrere Tage aufgezeichnet.

Tabelle 8.3: Übersicht über die durchgeführten viskosimetrischen Experimente mit verschiedenen Chitosanen.

Chitosan	Konzentration	Lysozym	Medium	NaCl	Kapillare
CS(42)	10 mg/mL	1,5 µg/mL	0,1 % AcOH	-	DIN IIc
CS(17)	10 mg/mL	1,5 µg/mL	0,1 % AcOH	-	DIN IIc
CS Sigma-Aldrich	10 mg/mL	1,5 µg/mL	0,1 % AcOH	-	DIN IIc
CS Sigma-Aldrich	10 mg/mL	-	0,1 % AcOH	-	DIN IIc
CS Sigma-Aldrich andere Charge	10 mg/mL	1,5 µg/mL	0,1 % AcOH	-	DIN IIc
CS(42)	3 mg/mL	1,5 µg/mL	Acetatpuffer pH 4,65	0,1 M	DIN Ic
CS(17)	3 mg/mL	1,5 µg/mL	Acetatpuffer pH 4,65	0,1 M	DIN Ic

8.6.3 CS(42)-TPP: Nanopartikel

CS(42) wurde in 0,1 % oder 1 % (v/v) AcOH gelöst um eine 1 mg/mL Chitosanlösung zu erhalten. Nachdem sich das CS(42) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL TPP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungsverhältnis bei 3:1 (CS:TPP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.6.4 CS(42)-TPP: Lagerungsstabilität

1 mL CS(42)-TPP Nanopartikelsuspension (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) wurden, wie in Kapitel 8.6.3 beschrieben, in einer Einwegküvette angesetzt. Die Probe wurde bei Raumtemperatur dunkel gelagert und im Verlauf von 14 Tagen regelmäßig mittels DLS charakterisiert.

8.6.5 CS(42)-TPP: Degradation mit Lysozym

990 µL CS(42)-TPP Nanopartikelsuspension (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) wurden in eine Einwegküvette gegeben und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurden 10 µL einer Lysozymlösung hinzugegeben, um eine Lysozymkonzentration von 1,5 µg/mL oder 150 µg/mL zu erhalten. Im Falle der mit Lysozym beladenen Nanopartikel wurde das Enzym

mit einer 1 mg/mL, 0,1 % AcOH CS(42)-Lösung vermischt und danach über die Zugabe von TPP zu Nanopartikeln vernetzt. Der jeweilige Degradationsprozess wurde über DLS mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C aufgezeichnet.

8.6.6 CS(42)-TPP: Stabilität bei 37 °C

1 mL CS(42)-TPP Nanopartikelsuspension (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) wurden, wie in Kapitel 8.6.3 beschrieben, in einer Einwegküvette angesetzt. Die Probe wurde bei 37 °C im Brutkasten gelagert und im Verlauf von etwa 7 Tagen regelmäßig mittels DLS charakterisiert.

8.6.7 CS(42)-TPP: Beschichtung

Die Beschichtung von Titansubstraten mit einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension erfolgte über eine 3-minütige Sprühbeschichtung (ca. 7 µL/min) der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2.

8.6.8 CS(42)-TPP: Beschichtung-XPS

Die Beschichtung von Titansubstraten mit einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension erfolgte über eine 3-minütige Sprühbeschichtung der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2. Als Referenz wurde ein frisch poliertes, blankes Titanplättchen verwendet.

8.6.9 CS(42)-TPP: Beschichtung-REM

Die Beschichtung von Titansubstraten mit einer CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikelsuspension erfolgte über eine 1,5-minütige Sprühbeschichtung der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2. Hierbei wurden die Titanplättchen mit einer Pinzette so gehalten, dass die Hälfte der Plättchen verdeckt war und über die Sprühbeschichtung nur eine Hälfte beschichtet wurde. Als Referenz diente wiederum ein frisch poliertes, blankes Titanplättchen. Alle verwendeten Plättchen wurden vor der Beschichtung (auch die Referenz) zuerst mit einem Wattestab und 1 % AcOH, dann für 30 Minuten im Plasmareiniger (75 W, Luft) und abschließend mit 1 % AcOH für 10 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Die Aufnahme der REM-Bilder erfolgte wie in Kapitel 8.4.4 beschrieben.

8.6.10 CS(42)-TPP: Beschichtungsstabilität

Die Beschichtung erfolgte wie in Kapitel 8.6.7 beschrieben. Jeweils 3 beschichtete Titanproben wurden in je 1 mL Millipore, PBS, Millipore mit 1,5 µg/mL Lysozym, PBS mit 1,5 µg/mL

Lysozym oder FBS in einer 24-Kammer-Mikrotiterplatte gelegt und bei 37 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden die Plättchen aus der Lösung entnommen, kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert, siehe Kapitel 8.4.3. Anschließend wurden die Titanplättchen jeweils in 1 mL frischem Medium bei 37 °C gelagert.

8.6.11 CS(42)-TPP-BMP-2: Nanopartikel

BMP-2 in MES-Puffer wurde in eine CS(42) 1 mg/mL Lösung in 0,1 % AcOH eingemischt. Über einen Vortexer wurde die Lösung homogenisiert. Im Anschluss wurde eine 1 mg/mL TPP-Lösung in Millipore hinzugefügt. Als Mischungsverhältnis von CS(42) zu TPP wurde 3:1 verwendet. Die resultierenden BMP-2 Konzentrationen waren 16 µg/mL, 17,25 µg/mL und 51,3 µg/mL für *in vitro* Untersuchungen und 32 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL und 500 µg/mL für *in vivo* Studien.

8.6.12 *In vitro*: CS(42)-TPP mit BMP-2 (ELISA)

Für eine typische Prozedur wurden CS(42)-TPP-BMP-2 (3:1, 1 mg/mL) Nanopartikel, wie in Kapitel 8.6.11 beschrieben, hergestellt, gevortext und nach 15 Minuten zur Beschichtung von Titansubstraten verwendet. Als Kontrolle dienten unbeladene CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL) Nanopartikel. Die Beschichtung der Titanplättchen erfolgte über eine Sprühbeschichtung mit den Nanopartikelsuspensionen, siehe Kapitel 8.4.2. Die Details der einzelnen Versuche sind in Tabelle 8.4 dargestellt.

Tabelle 8.4: Übersicht zu den durchgeführten BMP-2 Freisetzungsstudien von beschichteten Titansubstraten mittels ELISA.

AcOH in Partikelsuspension[%]	BMP-2 [µg/mL]	Sprühen	Einlagerungs- effizienz [%]	BMP-2 Freisetzung [ng/cm ²]
0,0375	17,25	200 µL	-	1600
0,0375	16	200 µL	88	2
0,0375	16	200 µL	91	30
0,075	51,3	3 min	97	8

Die beschichteten Titansubstrate wurden in Millipore Wasser geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und anschließend in einer 24-Kammer-Mikrotiterplatte mit je 1 mL PBS

oder 1 mL PBS mit 1,5 µg/mL Lysozym versetzt. Die Mikrotiterplatten wurden verschlossen und bei 37 °C und 94 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator gelagert. An bestimmten Zeitpunkten (z.B. 1h, 4h, 24h usw.) wurden jeweils 200 µL der Lösung entnommen und bis zur Quantifizierung im Kühlschrank gelagert. Die Kammern wurden daraufhin mit 200 µL der jeweiligen Lösung, PBS oder PBS mit Lysozym, aufgefüllt und die Mikrotiterplatten wieder in den Inkubator zurückgestellt. Zur Quantifizierung der eingelagerten BMP-2-Menge (über die Ausgangspartikelsuspension) und der freigesetzten BMP-2-Menge (über die entnommenen Proben) wurde ein BMP-2 sandwich ELISA nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

8.6.13 In vitro: CS(42)-TPP mit BMP-2 (BRE-Luc)

CS(42)-TPP-BMP-2 (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH, 16 µg/mL BMP-2) Nanopartikel wurden, wie in Kapitel 8.6.11 beschrieben, hergestellt, über einen Vortexer durchmischt und nach 15 Minuten zur Beschichtung von Titansubstraten verwendet. Als Kontrolle dienten unbeladene CS(42)-TPP (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel. Die Beschichtung der Titanplättchen erfolgte über eine dreiminütige Sprühbeschichtung, siehe Kapitel 8.4.2. Beide Seiten der beschichteten Proben wurden mittels UV-Strahlung für jeweils 20 Minuten sterilisiert. Im Anschluss wurden die Substrate zum Waschen jeweils in die Kammer einer Mikrotiterplatte in 1 mL PBS gelegt. Die Lösung wurde nach kurzem Schütteln abgesaugt. Danach erfolgte die Quantifizierung von biologisch aktivem BMP-2 über einen BRE-Luc Test, wie von EHLERT et al.^[134] beschrieben. Die beschichteten Titansubstrate wurden in einer 24-Kammer-Mikrotiterplatte mit je 1 mL einer Zellsuspension (C2C12/BRE-Luc Zellen, 35.000 Zellen pro Milliliter) besät. Den Zellen wurde 2 Stunden Zeit gegeben, um sich an der Oberfläche anzulagern. Daraufhin wurde die überschüssige Lösung abgesaugt. Im Anschluss wurden in jede Kammer der Mikrotiterplatte entweder 500 µL 10 % FBS oder 495 µL 10 % FBS plus 5 µL 150 µg/mL Lysozym in Millipore gegeben. Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank gelagert. Nach 2 Tagen wurden die Proben aus dem Brutschrank geholt, mit PBS gewaschen und dann für mindestens eine Stunde bei -70 °C eingefroren. Zur Quantifizierung wurde eine Zelllyse mit einem CAT Aufschlusspuffer (CAT ELISA kit, ROCHE, Mannheim, Germany) mit Proteaseinhibitoren (ROCHE, Mannheim) (70 µL pro Substrat) durchgeführt. Die Zellen wurden von den Titansubstraten abgeschabt, in Eppendorftubes überführt bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Luciferase-Nachweis wurde in 96-Kammer-Mikrotiterplatten mit 5 µL des Überstands der zentrifugierten Zellen mit 25 µL Luciferin Lösung durchgeführt. Die Quantifizierung der biologisch akti-

ven BMP-2-Menge erfolgte über die Standardreihen mittels linearer oder polynominaler Regression nach einer Hintergrundkorrektur.

8.6.14 *In vivo: Maus*

CS(42)-TPP-BMP-2 (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel wurden, wie in Kapitel 8.6.11 beschrieben, mit 100 µg/mL, 200 µg/mL und 500 µg/mL BMP-2 hergestellt. 10 µL dieser CS(42)-TPP-BMP-2 Nanopartikel wurden jeweils auf 3x3x3 mm Kollagenschwämme gegeben und in den rechten und linken caudalen Oberschenkelmuskel von drei weiblichen C3H/HeNHSd Mäusen (Harlan; 6-7 Wochen alt, eine Maus für jede BMP-2 Konzentration) implantiert. Als Kontrollen wurden Kollagenschwämme mit CS(42)-TPP Nanopartikel ohne BMP-2 oder reinem BMP-2 in jeweils eine weitere Maus implantiert. Vier Wochen nach der Operation wurden die Implantate explantiert und über Nacht bei 4 °C in 1 mL Paraformaldehyd (4 % in PBS) gelagert. Anschließend wurden die Explantate in 1 mL 16.8 % EDTA in PBS bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einer Woche dekalzifiziert. Abschließend wurden die Explantate in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden zur histologischen Untersuchung auf Glasobjektträgern über eine H&E-Färbung eingefärbt und mit einem Lichtmikroskop analysiert.

8.6.15 *In vivo: Kaninchen*

CS(42)-TPP-BMP-2 (3:1, 1 mg/mL, 0,075 % AcOH) Nanopartikel wurden, wie in Kapitel 8.6.11 beschrieben, mit 32 µg/mL BMP-2 hergestellt. Als Implantate wurden 3x3x3 mm große, hohle Titanzylinder eingesetzt. Diese wurden vor der Beschichtung mit Nanopartikeln für 2 h bei 180 °C in einem Ofen sterilisiert und für 30 min im Plasmareiniger gereinigt (75 W, Luft). Die Beschichtung erfolgte über Sprühbeschichtung mit einem ungefähren Volumenstrom von 2 µL/min mit einer Airbrush. Die Titanzylinder wurden dabei auf der in Abbildung 8.1 gezeigten Halterung fixiert und für 10 min automatisch im auftreffenden Aerosol rotiert. Anschließend wurden die beschichteten Titanzylinder zur Sterilisation der Proben für 20 min mit UV-Licht behandelt und in sterilen Mikrotiterplatten bis zur Implanta-

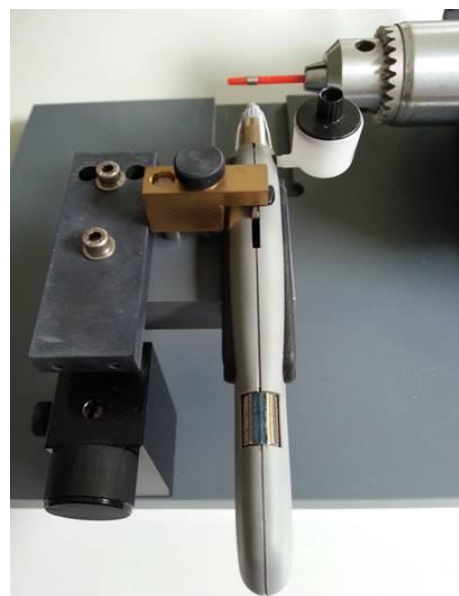


Abbildung 8.1: Darstellung einer Beschichtungsvorrichtung zur Beschichtung von Titanzylindern für einen Tierversuch.

tion gelagert. Als Kontrollproben zu den CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Proben dienten unbeschichtete Titanzylinder und mit CS(42)-TPP ohne BMP-2 beschichtete Titanzylinder.

In je ein Kaninchen (New Zealand White Rabbit) wurden jeweils zwei Titanzylinder, wie in Abbildung 4.32 gezeigt, in die Femurkondylen des linken und rechten Oberschenkelknochens mit einem „press-fit“-Verfahren implantiert. Ein Versuchstier für die unbeschichteten Zylinder, eines für die mit Kontrollpartikeln beschichteten Zylinder und eines für die CS(42)-TPP-BMP-2 beschichteten Zylinder. Nach 4 Wochen Standzeit wurden die Femurkondylen mit einem Teil des abgeschnittenen Femurs im μ -CT untersucht. Anschließend wurden die Proben für eine Technovit-Einbettung (Technovit 9100) zugesägt und nach der Einbettung geschnitten und entplastet. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Schnitte über eine Tolluidinblau-Färbung und die Auswertung am Lichtmikroskop.

8.7 Kapitel 6.1 – phosphoryliertes Chitosan

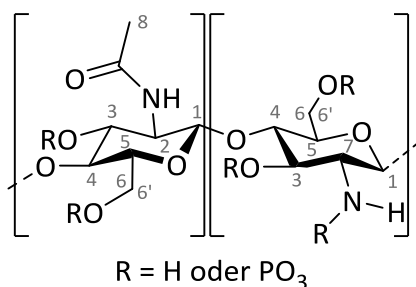
8.7.1 Phosphorylierung nach PRAMANIK et al.

Durchführung nach PRAMANIK et al.

100 mg CS(42) wurden bei 80 °C in 10 mL 1 %-iger Essigsäure gelöst. Zur Reaktionsmischung wurden 160 μ L 85 %-ige Phosphorsäure hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 110 °C unter Rückfluss für 2 h erhitzt. Die Reaktionslösung wurde danach in 300 mL dest. Aceton ausgefällt und über eine Por 4 Fritte abgezogen. Der Feststoff wurde daraufhin bei 45 °C über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Das Produkt wurde mittels ^1H -NMR, ^{31}P -NMR und Elementaranalyse charakterisiert. Über die Elementaranalyse konnte ein „Substitutionsgrad“ von 0,5 ermittelt werden.

^1H -NMR (D_2O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): 4,97-4,47 (m, HOD und 1 H_1); 4,05-3,44 (m, 5-6 H, H_{2-6}); 3,27-3,05 (s, 0-1 H, H_7); 2,27-2,17 (s, 6 H, Aceton); 2,15-1,96 (s, 3 H, H_8).

^{31}P -NMR (D_2O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): 0,65 (s, $\text{PO}(\text{OH})_2\text{OR}$).



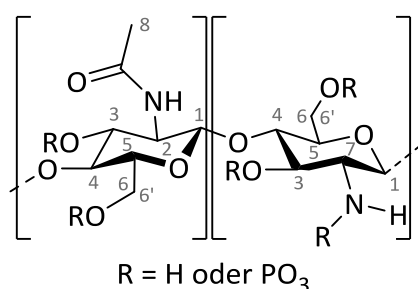
Elementaranalyse [%] = N (6,35); C (37,57); H (6,75).

Änderung der Aufarbeitung

101,9 mg Chitosan (60-120 kDa, 36 % DA) wurden bei 80 °C in 10 mL 1 %-iger Essigsäure gelöst. Zur Reaktionsmischung wurden 345 µL 85 %-ige Phosphorsäure hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 115 °C unter Rückfluss für 2 h erhitzt. Die Reaktionslösung wurde danach abgekühlt, filtriert und mittels Dialyse gegen dest. Wasser, 0,1 M NaCl Lösung und erneut dest. Wasser gereinigt. Nach der Dialyse wurde die Lösung eingefroren und das enthaltene Polymer über Gefriertrocknung gewonnen. Das Produkt wurde mittels ^1H -NMR und ^{31}P -NMR charakterisiert.

^1H -NMR (D_2O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): 4,98-4,50 (m, HOD und 1 H_1); 4,09-3,44 (m, 5-6 H, H_{2-6}); 3,29-3,07 (s, 0-1 H, H_7); 2,21-1,99 (s, 3 H, H_8).

^{31}P -NMR (D_2O und DCl, 400 MHz, δ in ppm): Kein Peak.

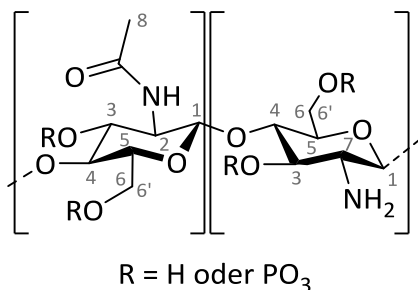


8.7.2 Phosphorylierung nach NISHI et al.

Für eine typische Durchführung wurden in einem Schnappdeckelglässchen 100 mg CS(42) vorgelegt, mit einer Stammlösung von Diphosphorpentoxid in Methansulfonsäure (2 äq/mL bezogen auf die eingesetzte Chitosanstoffmenge) versetzt und mit Methansulfonsäure auf ein Reaktionsvolumen von 5 mL aufgefüllt. Die Menge der Stammlösung wurde dabei so variiert, dass Molverhältnisse von Phosphorpentoxid zu Chitosan von 0,5-2 erhalten wurden. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei RT gerührt und im Anschluss in Aceton ausgefällt. Das ausgefällte Polymer wurde in dest. Wasser gelöst und gegen dest. Wasser, 0,1 M NaCl Lösung und abschließend wieder gegen dest. Wasser dialysiert. Daraufhin wurde die dialysierte Lösung eingefroren und das Polysaccharid wurde via Gefriertrocknung gewonnen. Das erhaltene Produkt (Ausbeute ca. 16 %, Molverhältnis 2:1) wurde mittels ^1H -NMR, ^{31}P -NMR und Elementaranalyse charakterisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): 5,02-4,53 (m, HOD und 1 H_1); 4,22-3,46 (m, 5-6 H, H_{2-6}); 3,36-3,08 (s, 0-1 H, H_7); 2,17-1,99 (s, 3 H, H_8).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): Kein Peak.



Elementaranalyse [%] = N (5,50); C (32,05); H (5,35).

8.7.3 Phosphorylierung nach AMARAL et al. – CSP(42)

Mit unbehandelten Chitosan von ALDRICH

Für eine typische Durchführung wurden 250 mg Chitosan (190-310 kDa, 15-25 % DA) mit 10 mL 2-Butanol in einem Schlenkkolben unter N_2 vorgelegt. Separat wurden 10 mL 85 %-ige Phosphorsäure mit 10 mL Triethylphosphat vermischt und 5,75 g P_2O_5 in dem Gemisch gelöst. Nachdem sich das P_2O_5 gelöst hatte, wurde die Lösung in den Schlenkkolben gegeben und die Reaktionslösung wurde für 72 h unter N_2 bei 30 °C gerührt. Der Feststoff wurde über einen Büchner-Trichter abfiltriert und mit dest. Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C. Der unlösliche Feststoff wurde mittels Elementaranalyse charakterisiert. Ein Substitutionsgrad von ca. 2,4 wurde erhalten.

Elementaranalyse [%] = N (3,76); C (21,41); H (4,86).

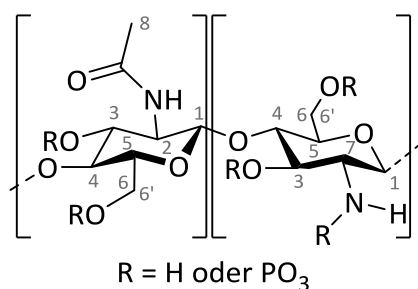
Mit acetyliertem CS(42)

Für eine typische Prozedur wurden 107,1 mg CS(42) mit 12 mL 2-Butanol in einem Schlenkkolben unter N_2 vorgelegt. In 4 mL 85 %-iger Phosphorsäure und 4 mL Triethylphosphat wurden separat 787,5 mg P_2O_5 gelöst. Anschließend wurde die Lösung zur Suspension hinzuge tropft und die Reaktionsmischung wurde für 48 h bei RT unter N_2 gerührt. Nach der Reaktion wurde die Lösung in Aceton ausgefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert und in 0,1 M NaOH gelöst. Das gelöste Produkt wurde über Dialyse gegen dest. Wasser, 0,1 M NaCl Lösung, 0,01 M NaOH und dest. Wasser gereinigt. Das erhaltene Produkt

(94,4 mg) wurde mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P-NMR}$ und Elementaranalyse charakterisiert. Der Substitutionsgrad von 0,34 wurde über die Elementaranalyse bestimmt.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): 4,99-4,51 (m, HOD und 1 H_1); 4,07-3,48 (m, 5-6 H, H_{2-6}); 3,26-3,06 (s, 0-1 H, H_7); 2,18-1,91 (s, 3 H, H_8).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): 0,94 (s, $\text{PO}(\text{OH})_2\text{OR}$).



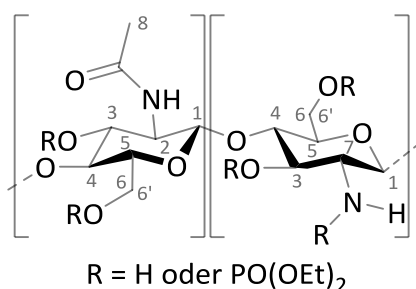
Elementaranalyse [%] = N (6,68); C (39,32); H (6,48); Cl (1,37).

8.7.4 Phosphorylierung nach CÁRDENAS *et al.* – CSDEP(42)

Für eine typische Reaktion wurden 110,8 mg CS(42) in 15 mL Diethylchlorophosphat in einem Schlenk Kolben suspendiert. Das Gemisch wurde 18 h unter Rückfluss bei 50 °C gerührt, durch Zugabe von Wasser gequenchet und mit 2 M NaOH versetzt, bis sich der Feststoff löst. Das gelöste Produkt wurde durch Dialyse gegen dest. Wasser, 0,1 M NaCl Lösung, 0,01 M NaOH und dest. Wasser gereinigt. Das erhaltene Produkt (198 mg) wurde mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P-NMR}$ und Elementaranalyse charakterisiert. Der Substitutionsgrad von 1,19 wurde über die Elementaranalyse bestimmt.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): 4,98-4,66 (m, HOD und 1 H_1); 4,19-4,04 (m, 4 H, CH_2 von $\text{PO}(\text{OEt})_2$); 4,04-3,85 (m, 4 H, CH_2 von $\text{PO}(\text{OEt})_2$); 3,88-3,32 (m, 5-6 H, H_{2-6}); 3,15-2,96 (s, 0-1 H, H_7); 1,98-1,86 (s, 3 H, H_8); 1,31-1,21 (t, 6 H, CH_3 von $\text{PO}(\text{OEt})_2$); 1,21-1,09 (t, 6 H, CH_3 von $\text{PO}(\text{OEt})_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O und DCl , 400 MHz, δ in ppm): 0,99-0,35 (m, $\text{PO}(\text{Et})_2\text{OR}$ / $\text{PO}(\text{OEt})_2\text{NR}$); kleine Peaks zwischen (-10,60)-(-12,34) möglicherweise Diethylphosphat-Rückstände.



Elementaranalyse [%] = N (4,10); C (33,73); H (6,18); Cl (Spuren).

8.7.5 CSP(42)-TPP: Nanopartikel

CSP(42) wurde in 0,1 % (v/v) AcOH gelöst, um eine 1 mg/mL Lösung zu erhalten. Nachdem sich das CSP(42) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL TPP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungsverhältnis bei 3:1 (CSP:TPP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.7.6 CSDEP(42)-TPP: Nanopartikel

CSDEP(42) wurde in 0,1 % (v/v) AcOH gelöst, um eine 1 mg/mL Lösung zu erhalten. Nachdem sich das CSDEP(42) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL TPP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungsverhältnis bei 5:1 (CSDEP:TPP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.7.7 CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Degradation mit Lysozym

990 µL von den in Kapitel 8.7.5 und 8.7.6 beschriebenen Nanopartikelsuspensionen wurden in eine Einwegküvette gegeben und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurden 10 µL einer LysozymbLösung (150 µg/mL in Millipore) hinzugegeben, um eine Lysozymkonzentration von 1,5 µg/mL zu erhalten. Der Degradationsprozess wurde über DLS mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C aufgezeichnet.

8.7.8 CSP(42) und CSDEP(42): Beschichtung

Die Beschichtung von Titansubstraten mit CSP(42) und CSDEP(42), jeweils 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, erfolgte über eine 1-minütige Sprühbeschichtung (ca. 7 μ L/min) der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2.

8.7.9 CSP(42) und CSDEP(42): Beschichtungsstabilität

Die Beschichtung erfolgte wie in Kapitel 8.7.8 beschrieben. Jeweils 3 beschichtete Titanproben wurden kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert, siehe Kapitel 8.4.3. Anschließend wurden die Titanplättchen im Ultraschallbad für 10 Minuten mit Millipore Wasser, PBS und 1 %-iger AcOH gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben wiederum kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert.

8.7.10 CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Beschichtung

Die Beschichtung von Titansubstraten mit den in Kapitel 8.7.5 und 8.7.6 beschriebenen Nanopartikelsuspensionen erfolgte über eine 3-minütige Sprühbeschichtung (ca. 7 μ L/min) der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2.

8.7.11 CSP(42)-TPP und CSDEP(42)-TPP: Beschichtungsstabilität

Die Beschichtung erfolgte wie in Kapitel 8.7.10 beschrieben. Jeweils 3 beschichtete Titanproben wurden kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert, siehe Kapitel 8.4.3. Anschließend wurden die Titanplättchen im Ultraschallbad für 10 Minuten mit Millipore Wasser, PBS und 1 %-iger AcOH gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben wiederum kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert.

8.8 Kapitel 6.2 – CS(42)-„DNA“

8.8.1 CS(42)-ThP: Nanopartikel

CS(42) wurde in 0,1 % (v/v) AcOH gelöst, um eine 1 mg/mL Lösung zu erhalten. Nachdem sich das CSP(42) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL ThP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungs-

verhältnis bei 1:1 (CS:ThP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.8.2 CS(42)-dTTP: Nanopartikel

CS (42) wurde in 0,1 % (v/v) AcOH gelöst, um eine 1 mg/mL Lösung zu erhalten. Nachdem sich das CSP(42) vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung mit 1 mg/mL ThP in Millipore versetzt und mit einer Eppendorfpipette durchmischt. Das Mischungsverhältnis wurde nur für die Partikelbildungstests variiert. Für alle weiteren Untersuchungen lag das Mischungsverhältnis bei 1:1 (CS:ThP). Die Charakterisierung erfolgte kurz nach der Partikelherstellung über DLS, siehe Kapitel 8.3.1.

8.8.3 CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Degradation mit Lysozym

990 µL von den in Kapitel 8.8.1 und 8.8.2 beschriebenen Nanopartikelsuspensionen wurden in eine Einwegküvette gegeben und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurden 10 µL einer LysozymbLösung (150 µg/mL in Millipore) hinzugegeben, um eine Lysozymkonzentration von 1,5 µg/mL zu erhalten. Der Degradationsprozess wurde über DLS mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C aufgezeichnet.

8.8.4 CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Beschichtung

Die Beschichtung von Titansubstraten mit den in Kapitel 8.8.1 und 8.8.2 beschriebenen Nanopartikelsuspensionen erfolgte über eine 3-minütige Sprühbeschichtung (ca. 7 µL/min) der Titanplättchen, siehe Kapitel 8.4.2.

8.8.5 CS(42)-ThP und CS(42)-dTTP: Beschichtungsstabilität

Die Beschichtung erfolgte wie in Kapitel 8.8.4 beschrieben. Jeweils 3 beschichtete Titanproben wurden kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert, siehe Kapitel 8.4.3. Anschließend wurden die Titanplättchen im Ultraschallbad für 10 Minuten mit Millipore Wasser gewaschen und wiederum kurz in Millipore geschwenkt, in einem Luftstrom getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt (Destatis): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - Ausführliche Darstellung - 2012.
- [2] M. Otto, J. Kriegsmann, T. Gehrke, S. Bertz: Abriebpartikel. *Der Pathologe* **2006**, 27; 447–460.
- [3] G. Subbiahdoss, R. Kuijter, D. W. Grijpma, H. C. van der Mei, H. J. Busscher: Microbial biofilm growth vs. tissue integration: “The race for the surface” experimentally studied. *Acta Biomaterialia* **2009**, 5; 1399–1404.
- [4] S. Zysk, H. Gebhard, W. Plitz, K. Meßmer, A. Veihelmann, C. Pellengahr, H. J. Refior: Inflammatorische Reaktion auf Abriebpartikel von Endoprothesen in vivo. *Der Orthopäde* **2003**, 32; 305–311.
- [5] A. G. Gristina: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **1987**, 237; 1588–1595.
- [6] J. M. Schmitt, K. Hwang, S. R. Winn, J. O. Hollinger: Bone morphogenetic proteins: An update on basic biology and clinical relevance. *Journal of Orthopaedic Research* **1999**, 17; 269–278.
- [7] J. O. Hollinger, J. M. Schmitt, D. C. Buck, R. Shannon, S.-P. Joh, H. D. Zegzula, J. Wozney: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research* **1998**, 43; 356–364.
- [8] J. M. Wozney: Bone Morphogenetic Proteins. *Progress in Growth Factor Research* **1989**, 1; 267–280.
- [9] N. Adden, L. J. Gamble, D. G. Castner, A. Hoffmann, G. Gross, H. Menzel: Phosphonic Acid Monolayers for Binding of Bioactive Molecules to Titanium Surfaces. *Langmuir* **2006**, 22; 8197–8204.
- [10] C. Lorenz, A. Hoffmann, G. Gross, H. Windhagen, P. Dellinger, K. Möhwald, W. Dempwolf, H. Menzel: Coating of Titanium Implant Materials with Thin Polymeric Films for Binding the Signaling Protein BMP2. *Macromolecular Bioscience* **2011**, 11; 234–244.
- [11] H. Jonassen, A.-L. Kjøniksen, M. Hiorth: Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* **2012**, 13; 3747–3756.

- [12] L. W. Kleiner, J. C. Wright, Y. Wang: Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2014**, *181*; 1–10.
- [13] S. Parveen, R. Misra, S. K. Sahoo: Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, *8*; 147–166.
- [14] I. F. Uchegbu, A. G. Schätzlein: Polymers in drug delivery, **2006**, *CRC Taylor & Francis*, Boca Raton, Fla.
- [15] A. Kabanov, S. Vinogradov: Nanogels as Pharmaceutical Carriers, In: Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers (V. Torchilin; eds.) **2008**, *Springer New York*, 67–80.
- [16] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei: Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*; 1638–1649.
- [17] Z. M. Wu, X. G. Zhang, C. Zheng, C. X. Li, S. M. Zhang, R. N. Dong, D. M. Yu: Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *37*; 198–206.
- [18] Y. Zhang, L. Tao, S. Li, Y. Wei: Synthesis of Multiresponsive and Dynamic Chitosan-Based Hydrogels for Controlled Release of Bioactive Molecules. *Biomacromolecules* **2011**, *12*; 2894–2901.
- [19] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, R. Gurny: Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57*; 35–52.
- [20] T. E. L. Douglas, A. Skwarczynska, Z. Modrzejewska, L. Balcaen, D. Schaubroeck, S. Lycke, F. Vanhaecke, P. Vandenabeele, P. Dubruel, J. A. Jansen, S. C. G. Leeuwenburgh: Acceleration of gelation and promotion of mineralization of chitosan hydrogels by alkaline phosphatase. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *56*; 122–132.
- [21] S. J. Buwalda, K. W. M. Boere, P. J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W. E. Hennink: Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*; 254–273.
- [22] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa: Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*; 27–46.
- [23] A. S. Hoffman: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *43*; 3–12.

- [24] V. Mailänder, K. Landfester: Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* **2009**, *10*; 2379–2400.
- [25] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang: Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*; 1650–1662.
- [26] V. Torchilin: Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers: Development of the Concept, In: Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers (V. Torchilin; eds.) **2008**, *Springer New York*, 1-32.
- [27] R. J. Verheul, S. van der Wal, W. E. Hennink: Tailorable Thiolated Trimethyl Chitosans for Covalently Stabilized Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2010**, *11*; 1965–1971.
- [28] M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely: Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2005**, *6*; 2521–2527.
- [29] S. Balthasar, K. Michaelis, N. Dinauer, H. von Briesen, J. Kreuter, K. Langer: Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* **2005**, *26*; 2723–2732.
- [30] D. Jeevitha, K. Amarnath: Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *101*; 126–134.
- [31] M. Chen, S. Gao, M. Dong, J. Song, C. Yang, K. A. Howard, J. Kjem, F. Besenbacher: Chitosan/siRNA Nanoparticles Encapsulated in PLGA Nanofibers for siRNA Delivery. *ACS Nano* **2012**, *6*; 4835–4844.
- [32] R. C. Nagarwal, R. Kumar, J. K. Pandit: Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47*; 678–685.
- [33] N. Kato, U. Hasegawa, N. Morimoto, Y. Saita, K. Nakashima, Y. Ezura, H. Kurosawa, K. Akiyoshi, M. Noda: Nanogel-based delivery system enhances PGE2 effects on bone formation. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*; 1063–1070.
- [34] N. Zhang, P. Wardwell, R. Bader: Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2013**, *5*; 329–352.
- [35] J. Hyung Park, S. Kwon, M. Lee, H. Chung, J.-H. Kim, Y.-S. Kim, R.-W. Park, I.-S. Kim, S. Bong Seo, I. C. Kwon, S. Young Jeong: Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity. *Biomaterials* **2006**, *27*; 119–126.

- [36] Y. Wang, Q. Jiang, L. R. Liu, Q. Zhang: The interaction between bovine serum albumin and the self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan. *Polymer* **2007**, 48; 4135–4142.
- [37] W. J. Stark: Nanoparticles in Biological Systems. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2011**, 50; 2–21.
- [38] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi: Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, 100; 5–28.
- [39] F. Kühn: Polykation-DNA-Komplexe (Dissertation), **2012**, Mainz.
- [40] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron: Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, 44; 65–73.
- [41] Q. Gan, T. Wang: Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, 59; 24–34.
- [42] H. Honarkar, M. Barikani: Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem* **2009**, 140; 1403–1420.
- [43] S. Q. Liu: Bioregenerative engineering, **2007**, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- [44] Q. Li, E. Dunn, E. Grandmaison, M. Goosen: Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1992**, 7; 370–397.
- [45] T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian, M. S. Shoichet: Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* **2005**, 26; 5872–5878.
- [46] P. K. Dutta: Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* **2004**, 63; 20–31.
- [47] P. Baldrick: The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2010**, 56; 290–299.
- [48] R. Muzzarelli, V. Baldassarre, F. Conti, P. Ferrara, G. Biagini, G. Gazzanelli, V. Vasi: Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials* **1988**, 9; 247–252.
- [49] M. Leedy, H. Martin, P. A. Norowski, J. A. Jennings, W. Haggard, J. Bumgardner: Use of Chitosan as a Bioactive Implant Coating for Bone-Implant Applications, In: Chitosan for Biomaterials II (R. Jayakumar, M. Prabakaran, R. A. A. Muzzarelli; eds.) **2011**, Springer Berlin Heidelberg, 129-165.

- [50] C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma: Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* **2009**, 34; 641–678.
- [51] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, E. Chiellini: Chitosan--A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36; 981–1014.
- [52] T. Kean, M. Thanou: Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62; 3–11.
- [53] J. Brouwer, T. van Leeuwen-Herberts, Ruit, M. Otten-van de Ruit: Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta* **1984**, 142; 21–30.
- [54] P. Venge, T. Foucard, J. Henriksen, L. Håkansson, A. Kreuger: Serum-levels of lactoferrin, lysozyme and myeloperoxidase in normal, infection-prone and leukemic children. *Clinica Chimica Acta* **1984**, 136; 121–130.
- [55] J. Hankiewicz, E. Swierczek: Lysozyme in human body fluids. *Clinica Chimica Acta* **1974**, 57; 205–209.
- [56] A. Fakhry, G. B. Schneider, R. Zaharias, S. Şenel: Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials* **2004**, 25; 2075–2079.
- [57] E. E. Golub, K. Boesze-Battaglia: The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* **2007**, 18; 444–448.
- [58] H.-Y. Lin, J.-H. Chen: Osteoblast differentiation and phenotype expressions on chitosan-coated Ti-6Al-4V. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 97; 618–626.
- [59] I. S. Kulaev, V. M. Vagabov, T. V. Kulakovskaia: The biochemistry of inorganic polyphosphates, **2004**, J. Wiley, Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ.
- [60] F. Rashchi, J. A. Finch: Polyphosphates: A review their chemistry and application with particular reference to mineral processing. *Minerals Engineering* **2000**, 13; 1019–1035.
- [61] A. Kornberg, N. N. Rao and, D. Ault-Riché: Inorganic Polyphosphates: A Molecule of Many Functions. *Annual Reviews Biochemistry* **1999**, 68; 89–125.
- [62] R. Palmeira-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira, C. Gaspar, S. Silvestre, J. Martinez-de-Oliveira, M. H. Amaral, L. Breitenfeld: Sodium Tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-Candida activity. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 421; 130–134.

- [63] Leon A. Heppel, D. R. Harkness, R. J. Hilmo: A Study of the Substrate Specificity and Other Properties A Study of the Substrate Specificity and Other Properties of the Alkaline Phosphatase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **1962**, 237; 841–846.
- [64] T. Albrektsson, C. Johansson: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **2001**, 10; 96–101.
- [65] X. Ying, L. Sun, X. Chen, H. Xu, X. Guo, H. Chen, J. Hong, S. Cheng, L. Peng: Silibinin promotes osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells via bone morphogenetic protein signaling. *European Journal of Pharmacology* **2013**, 721; 225–230.
- [66] A. Wirries, A.-K. Schubert, R. Zimmermann, S. Jabari, S. Ruchholtz, N. El-Najjar: Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *International Immunopharmacology* **2013**, 15; 381–386.
- [67] N. Harmankaya, J. Karlsson, A. Palmquist, M. Halvarsson, K. Igawa, M. Andersson, P. Tengvall: Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta Biomaterialia* **2013**, 9; 7064–7073.
- [68] M. Chatzinikolaïdou, T. K. Lichtinger, R. T. Müller, H. P. Jennissen: Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. *Acta Biomaterialia* **2010**, 6; 4405–4421.
- [69] S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares, N. Messadeq, A. Dierich, Johnston, A. P. R., D. Mainard, J.-C. Voegel, F. Caruso, N. Benkirane-Jessel: Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, 107; 3406–3411.
- [70] N. J. Shah, J. Hong, Hyder, Md. Nasim, P. T. Hammond: Osteophilic Multilayer Coatings for Accelerated Bone Tissue Growth. *Advanced Materials* **2012**, 24; 1445–1450.
- [71] T. J. Martin, N. A. Sims, J. M. Quinn: Interactions Among Osteoblasts, Osteoclasts, and Other Cells in Bone, In: Osteoimmunology (J. Lorenzo, Y. Choi, M. Horowitz, H. Takayanagi; eds.) **2011**, Elsevier, 227–267.
- [72] C.-J. Wu, H.-K. Lu: Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis - a mini review. *Journal of Dental Sciences* **2008**, 3; 13–21.

- [73] P. D. Biase, R. Capanna: Clinical applications of BMPs. *Proceedings from the 1st European Clinical Symposium on Bone and Tissue Regeneration 27-28 November 2004* **2005**, 36; 43–46.
- [74] G. B. Bishop, T. A. Einhorn: Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *International Orthopaedics (SICOT)* **2007**, 31; 721–727.
- [75] B. Bragdon, O. Moseychuk, S. Saldanha, D. King, J. Julian, A. Nohe: Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signalling* **2011**, 23; 609–620.
- [76] J. C. Wang, J. Kim: Bone Morphogenetic Proteins in Spine Surgery. *Spine* **2008**, 3; 18–20.
- [77] D. Obradovic-Wagner, C. Sieber, R. Bhushan, J. H. Borgermann, D. Graf, P. Knaus: BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins. *Science Signaling* **2010**, 3; mr1.
- [78] Sigma-Aldrich: Bone Morphogenetic Protein 2: human recombinant expressed in E. coli. **24.02.2014**, <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/b3555dat.pdf>.
- [79] M. L. Macdonald, R. E. Samuel, N. J. Shah, R. F. Padera, Y. M. Beben, P. T. Hammond: Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials* **2011**, 32; 1446–1453.
- [80] A. Bandyopadhyay, P. S. Yadav, P. Prashar: BMP signaling in development and diseases: A pharmacological perspective. *Biochemical Pharmacology* **2013**, 85; 857–864.
- [81] E. J. Carragee, E. L. Hurwitz, B. K. Weiner: A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *The Spine Journal* **2011**, 11; 471–491.
- [82] B. K. Weiner, E. L. Hurwitz, M. L. Schoene, E. J. Carragee: Moving forward after YODA. *The Spine Journal* **2013**, 13; 995–997.
- [83] A. Hoffmann, H. A. Weich, G. Gross, G. Hillmann: Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 57; 294–308.
- [84] H. P. Jennissen, T. Zumbink, M. Chatzinikolaidou, J. Steppuhn: Biocoating of Implants with Mediator Molecules: Surface Enhancement of Metals by Treatment with Chromosulfuric Acid. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **1999**, 30; 838–845.

- [85] J. Becker, A. Kirsch, F. Schwarz, M. Chatzinikolaïdou, D. Rothamel, V. Lekovic, H. Jennissen: Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clinical Oral Investigations* **2006**, 10; 217–224.
- [86] A. Sachse, A. Wagner, M. Keller, O. Wagner, W.-D. Wetzel, F. Layher, R.-A. Venbrocks, P. Hortschansky, M. Pietraszczyk, B. Wiederanders, H. J. Hempel, J. Bossert, J. Horn, K. Schmuck, J. Mollenhauer: Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone* **2005**, 37; 699–710.
- [87] D. A. Puleo, R. A. Kissling, M. S. Sheu: A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* **2002**, 23; 2079–2087.
- [88] Z. Shi, K. G. Neoh, E. T. Kang, C. K. Poh, W. Wang: Surface Functionalization of Titanium with Carboxymethyl Chitosan and Immobilized Bone Morphogenetic Protein-2 for Enhanced Osseointegration. *Biomacromolecules* **2009**, 10; 1603–1611.
- [89] S. E. Kim, S.-H. Song, Y. P. Yun, B.-J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H.-J. Moon, Y.-D. Kwon: The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials* **2011**, 32; 366–373.
- [90] Zhilong Shi, Koon Gee Neoh, En-Tang Kang, Chyekhoon Poh, Wilson Wang: Titanium with Surface-Grafted Dextran and Immobilized Bone Morphogenetic Protein-2 for Inhibition of Bacterial Adhesion and Enhancement of Osteoblast Functions. *Tissue Engineering Part A* **2009**, 15; 417–426.
- [91] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart: Layer-By-Layer Films as a Biomimetic Reservoir for rhBMP-2 Delivery: Controlled Differentiation of Myoblasts to Osteoblasts. *Small* **2009**, 5; 598–608.
- [92] T. Crouzier, A. Szarpak, T. Boudou, R. Auzély-Velty, C. Picart: Polysaccharide-Blend Multilayers Containing Hyaluronan and Heparin as a Delivery System for rhBMP-2. *Small* **2010**, 6; 651–662.
- [93] S. E. Bae, J. Choi, Y. K. Joung, K. Park, D. K. Han: Controlled release of bone morphogenetic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface. *Journal of Controlled Release* **2012**, 160; 676–684.

- [94] C. Chen, S.-M. Zhang, I.-S. Lee: Immobilizing bioactive molecules onto titanium implants to improve osseointegration. *Surface and Coatings Technology* **2013**, 228; 312–317.
- [95] H. J. Martin, K. H. Schulz, J. D. Bumgardner, K. B. Walters: An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan. *Applied Surface Science* **2008**, 254; 4599–4605.
- [96] S. Zankovych, M. Diefenbeck, J. Bossert, T. Mückley, C. Schrader, J. Schmidt, H. Schubert, S. Bischoff, M. Faucon, U. Finger, K. D. Jandt: The effect of polyelectrolyte multi-layer coated titanium alloy surfaces on implant anchorage in rats. *Acta Biomaterialia* **2013**, 9; 4926–4936.
- [97] Z. Wang, X. Zhang, J. Gu, H. Yang, J. Nie, G. Ma: Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates. *Carbohydrate Polymers* **2014**, 103; 38–45.
- [98] T. Jiang, Z. Zhang, Y. Zhou, Y. Liu, Z. Wang, H. Tong, X. Shen, Y. Wang: Surface Functionalization of Titanium with Chitosan/Gelatin via Electrophoretic Deposition: Characterization and Cell Behavior. *Biomacromolecules* **2010**, 11; 1254–1260.
- [99] C. Viorner, Y. Chevolot, D. Léonard, B.-O. Aronsson, P. Péchy, H. J. Mathieu, P. Descouts, M. Grätzel: Surface Modification of Titanium with Phosphonic Acid To Improve Bone Bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir* **2002**, 18; 2582–2589.
- [100] M. Lefort, G. Popa, E. Seyrek, R. Szamocki, O. Felix, J. Hemmerlé, L. Vidal, J.-C. Voegel, F. Boulmedais, G. Decher, P. Schaaf: Spray-On Organic/Inorganic Films: A General Method for the Formation of Functional Nano- to Microscale Coatings. *Angewandte Chemie* **2010**, 122; 10308–10311.
- [101] C. A. Schütz, L. Juillerat-Jeanneret, P. Käuper, C. Wandrey: Cell Response to the Exposure to Chitosan–TPP//Alginate Nanogels. *Biomacromolecules* **2011**, 12; 4153–4161.
- [102] K. Konecni, N. H. Low, M. T. Nickerson: Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry* **2012**, 134; 1775–1779.
- [103] M. Wang, Y. She, Z. Xiao, J. Hu, R. Zhou, J. Zhang: The green adsorption of chitosan tripolyphosphate nanoparticles on cotton fiber surfaces. *Carbohydrate Polymers* **2014**, 101; 812–818.

- [104] G. A. Morris, J. Castile, A. Smith, G. G. Adams, S. E. Harding: The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) - chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*; 1430–1434.
- [105] W.-L. Du, S.-S. Niu, Y.-L. Xu, Z.-R. Xu, C.-L. Fan: Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *75*; 385–389.
- [106] E. S. K. Tang, M. Huang, L. Y. Lim: Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *265*; 103–114.
- [107] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières: Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* **1999**, *40*; 7029–7032.
- [108] F.-L. Mi, S.-S. Shyu, S.-T. Lee, T.-B. Wong: Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1999**, *37*; 1551–1564.
- [109] Shouren Ge, K. Kojio, A. Takahara, T. Kajiyama: Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1998**, *9*; 131–150.
- [110] K. Y. Lee, W. S. Ha, W. H. Park: Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. *Biomaterials* **1995**, *16*; 1211–1216.
- [111] K. M. Vårum, M. M. Myhr, R. J. N. Hjerde, O. Smidsrød: In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research* **1997**, *299*; 99–101.
- [112] K. Tomihata, Y. Ikada: In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* **1997**, *18*; 567–575.
- [113] D. Ren, H. Yi, W. Wang, X. Ma: The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*; 2403–2410.
- [114] R. J. Nordtveit, K. M. Vårum, O. Smidsrød: Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydrate Polymers* **1994**, *23*; 253–260.

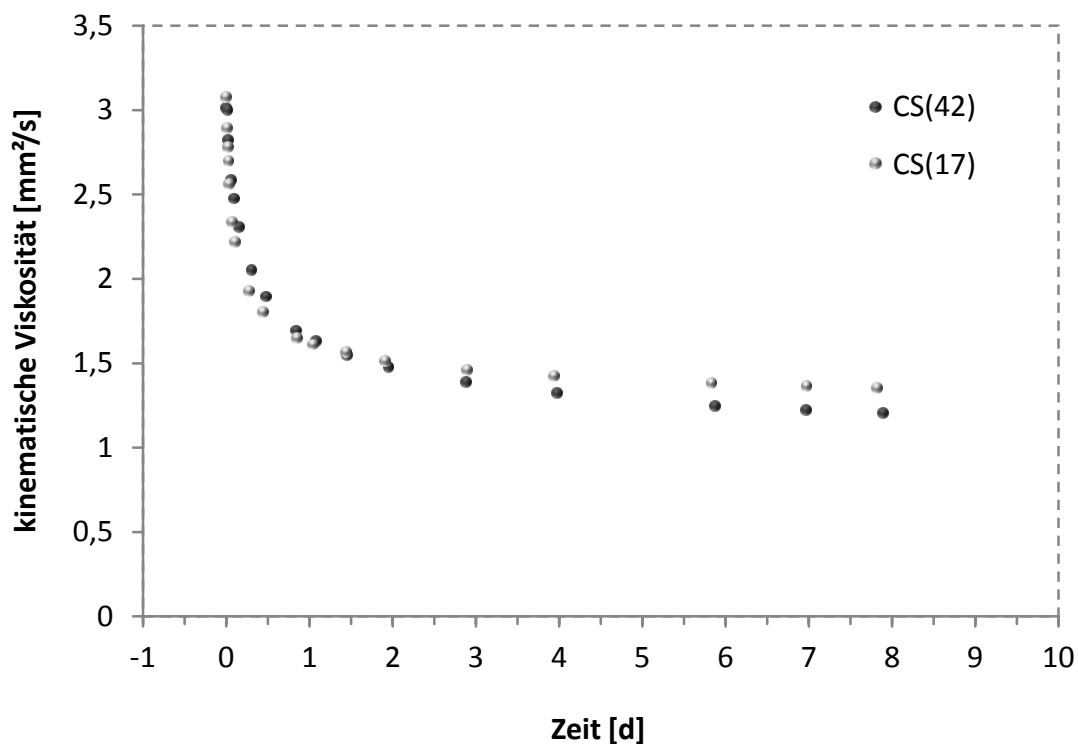
- [115] R. J. Nordtveit, K. M. Vårum, O. Smidsrød: Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydrate Polymers* **1996**, *29*; 163–167.
- [116] P. S. Pourshahab, K. Gilani, E. Moazeni, H. Eslahi, M. R. Fazeli, H. Jamalifar: Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. *Journal of Microencapsulation* **2011**, *28*; 605–613.
- [117] Malvern Instruments (Dr. Rolf Nitzsche): Intensivkurs - Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential (Unterlagen zum Seminar), **2011**.
- [118] T. T. B. Nguyen, S. Hein, C.-H. Ng, W. F. Stevens: Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *107*; 2588–2593.
- [119] U. Meier-Westhues: Polyurethane, **2007**, Vincentz Network, Hannover.
- [120] A. Abarrategi, J. García-Cantalejo, C. Moreno-Vicente, A. Civantos, V. Ramos, J. V. S. Casado, S. Pérez-Rial, R. Martnez-Corriá, J. L. López-Lacomba: Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*; 2633–2646.
- [121] R. Jayakumar, N. Selvamurugan, S. V. Nair, S. Tokura, H. Tamura: Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan—An overview. *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, *43*; 221–225.
- [122] I. F. Amaral, P. L. Granja and M. A. Barbosa: Chemical modification of chitosan by phosphorylation - an XPS, FT-IR and SEM study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2005**, *16*; 1575–1593.
- [123] N. Nishi, A. Ebina, S.-i. Nishimura, A. Tsutsumi, O. Hasegawa, S. Tokura: Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* **1986**, *8*; 311–317.
- [124] G. Cárdenas, G. Cabrera, E. Taboada, M. Rinaudo: Synthesis and Characterization of Chitosan Alkyl Phosphate. *Journal of the Chilean Chemical Society* **2006**, *51*; 815–820.
- [125] N. Pramanik, D. Mishra, I. Banerjee, T. K. Maiti, P. Bhargava, P. Pramanik: Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan

- Phosphate Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Applications. *International Journal of Biomaterials* **2009**, 2009; 1–8.
- [126] Sigma-Aldrich: Methansulfonsäure. **11.06.2014**,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/471356?lang=de®ion=DE>.
- [127] B. Grünler: Oberflächentechnik für die Praxis, **2013**, *Innovent e.V.*, Jena.
- [128] E. Talvitie, J. Leppiniemi, A. Mikhailov, V. P. Hytönen, M. Kellomäki: Peptide-functionalized chitosan–DNA nanoparticles for cellular targeting. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 89; 948–954.
- [129] T. Philipps: Statistische und dynamische Lichtstreuung von hochmolekularen Lösungen und Suspensionen (Dissertation), **1991**, Duisburg.
- [130] C. M. Keck, R. H. Müller: Moderne Pharmazeutische Technologie 2009. **20.10.2010**,
<http://www.pharmazie-lehrbuch.de/Moderne%20Pharmazeutische%20Technologie.pdf>.
- [131] H. Motschmann, R. Teppner: Ellipsometry in interface science, In: Studies in Interface Science Novel Methods to Study Interfacial Layers (D. Möbius, R. Miller; eds.) **2001**, *Elsevier*, 1–42.
- [132] Harland G. Tompkins: A User's Guide to Ellipsometry, **1993**, *Academic Press*, San Diego.
- [133] J. C. Vickerman, I. S. Gilmore: Surface analysis, **2009**, *Wiley*, Chichester, U.K.
- [134] N. Ehlert, A. Hoffmann, T. Luessenhop, G. Gross, P. P. Mueller, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens: Amino-modified silica surfaces efficiently immobilize bone morphogenetic protein 2 (BMP2) for medical purposes. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7; 1772–1779.

Anhang

Vorbemerkung: Die hier im Anhang präsentierte Modellrechnung und Diskussion wurden nach der Einreichung der Dissertation in Vorbereitung auf die Disputation erarbeitet und werden auf Wunsch des Mentors Prof. Dr. Henning Menzel eingefügt.

Berechnungen zur in Kapitel 4.2 angesprochenen Viskositätsmessung von CS(17) in Anlehnung an die Arbeiten von NORDTVEIT et al.^[114].



Messung der kinematischen Viskosität einer 3 mg/mL Chitosanlösung (DA 17 %) in Essigsäure-Acetatpuffer (pH 4,65) mit 0,1 M Natriumchlorid während der Degradation mit 1,5 µg/mL Lysozym bei 37 °C im Vergleich zu einer identischen DA 42 % Chitosanlösung.

Annahmen

Für die nachfolgend durchgeführte Modellrechnung werden folgende Annahmen getroffen:

- CS(17) hat ein Molekulargewicht von 250 kDa mit 170 g/monomol
- Der Mark-Houwink-Parameter von CS(17) entspricht einem idealen Knäul ($\alpha = 0,5$)
- Die Dichte der Lösung entspricht $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$
- Die enzymatische Spaltung von CS(17) ist für 3x N-Acetylglucosamin in Folge möglich

Modellrechnung

Die Wahrscheinlichkeit für 3x-N-Acetylglucosamin in Folge in CS(17) beträgt $0,17 \cdot 0,17 \cdot 0,17$. Somit besteht für jede Dreiersequenz im CS(17) eine Chance von ungefähr 0,5 % enzymatisch spaltbar zu sein. Bei den Annahmen für Molekular- und Wiederholungseinheitsgewicht folgt, dass es $(250000/170) - 2 \approx 1500$ verschiedene Dreiersequenzen in jeder Chitosankette gibt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit eine 3x-N-Acetylglucosaminsequenz in einem CS(17)-Molekül anzutreffen $1500 \cdot 0,005 = 7,5$. Im Durchschnitt kommt diese Sequenz also ca. 8x pro CS(17)-Molekül vor. Dies bedeutet wiederum, dass jedes CS(17)-Molekül im Optimalfall 8x gespalten und das Molekulargewicht somit auf $1/9$ des Ausgangsmolekulargewichts reduziert werden kann. Wird nun unter der Annahme von $\alpha = 0,5$ die Molekulargewichtsreduktion in die Mark-Houwink-Gleichung eingesetzt, lässt sich der Einfluss der Molekulargewichtsreduktion auf die intrinsische Viskosität der Lösung bestimmen: $[\eta] = K \cdot (M/9)^\alpha$. In diesem Fall wird die intrinsische Viskosität um Wurzel 9, also $[\eta]/3$, reduziert. Dies entspricht einer Abnahme der intrinsischen Viskosität um 66 %. Da man $[\eta]$ über die Auftragung von η_{spez} / c gegen c erhält, folgt draus, dass auch η_{spez} um 66 % reduziert wird. Die spezifische Viskosität kann wie folgt erhalten und nach der dynamischen Viskosität aufgelöst werden: $1/3 \cdot \eta_{\text{spez}} = (\text{dynamische Viskosität} / \text{Viskosität des Lösungsmittels}) - 1 = (\eta / \eta_0) - 1 \rightarrow \eta = 1/3 \cdot \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0$. Da die in dieser Arbeit gemessene kinematische Viskosität (ν) über $\nu = \eta / \rho$ erhalten werden kann, folgt für die Annahme $\rho = 1 \text{ g/cm}^3 \rightarrow \nu = 1/3 \cdot \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0$. Um die Auswirkung der Molekulargewichtsreduktion auf die kinematische Viskosität abzuschätzen, werden die Ergebnisse von $\nu = 1/3 \cdot \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0$ und $\nu = \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0$ miteinander verglichen. In der oben gezeigten Messung war $\eta_0 = 0,8$ und $\eta_{\text{spez}} = 2,75$ kann über $\eta_{\text{spez}} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 = (3 - 0,8) / 0,8$ berechnet werden.

$$\rightarrow \nu \text{ für } M/9 = 1/3 \cdot \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0 = 1,5$$

$$\rightarrow \nu = \eta_{\text{spez}} \cdot \eta_0 + \eta_0 = 3$$

Über diese Berechnung wäre eine Reduktion der kinematischen Viskosität von 50 % zu erwarten, wenn eine Molekulargewichtsreduktion auf $1/9$ des Ausgangsgewichts eintritt. Dieses Verhalten ist auch ungefähr in der im Anhang gezeigten Viskositätsmessung zu sehen.

Diskussion

Die Modellrechnung verdeutlicht, dass die starke Reduktion der Viskosität für CS(17) über eine Degradation mit Lysozym durchaus zu erwarten ist. Wieso in den Messungen kein Unterschied in der Abfallgeschwindigkeit der Viskosität zwischen CS(17) und CS(42) festgestellt werden konnte, ist vermutlich auf eine zu geringe Lysozymkonzentration zurückzuführen. In einem Milliliter der Messlösung befinden sich $1,5 \mu\text{g}$ Lysozym (14300 g/mol) $\approx 1,05 \cdot 10^{-10} \text{ mol}$. Im Vergleich dazu sind im Beispiel der oben gezeigten Messung mit 3 mg/mL Chitosan $1,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ Chitosan enthalten. Das heißt, dass auf jedes Lysozymmolekül $120/1,05 = 114$ Chitosanmoleküle kommen. Darüber hinaus kann jedes CS(17)-Molekül, wie oben berechnet, 8x gespalten werden. Somit hat jedes Lysozymmolekül $8 \cdot 114 = 912$ Spaltmöglichkeiten. Dies verdeutlicht, dass selbst im Fall von CS(17) jedes Lysozym über sehr viele Reaktionsmöglichkeiten verfügt. Die bessere Degradierbarkeit des CS(42) aufgrund der erhöhten Anzahl an Spaltmöglichkeiten im CS(42) (ca. $111 \cdot 114 = 12654$) sollte dementsprechend erst nach einer langen Messzeit oder für eine stark erhöhte Lysozymkonzentration messbar sein. Dies ist auch in den oben gezeigten Messungen zu erkennen, da mit zunehmender Messdauer immer größere Unterschiede zwischen CS(17) und CS(42) festgestellt werden können.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von NORDTVEIT et al. sieht man hier einen anderen Degradationsverlauf, da in dieser Arbeit mit der Lysozymkonzentrationen von humanem Serum ($1,5 \mu\text{g/mL}$) gearbeitet wurde.^[53] In den Arbeiten von Nordtveit et al. wurden bis zu $600 \mu\text{g/mL}$ Lysozym verwendet, was der 400fachen Menge an Lysozym entspricht.^[114] Somit kann in Übereinstimmung mit der zuvor geführten Diskussion die schnellere Degradation von weniger stark deacetylierten Chitosanen aufgelöst werden, da für das Beispiel von CS(17) jedes Lysozym nur noch 2,3 Spaltmöglichkeiten hätte und im Fall von CS(42) noch über 31,6 Spaltmöglichkeiten verfügen würde.

Der starke Unterschied zu den in Kapitel 4.2 angesprochenen Untersuchungen an Chitosanfilmen und Chitosan-„Scaffolds“ ist auf die gute Zugänglichkeit des CS(17) in dieser Arbeit auf Grund der Messung in Lösung zurückzuführen. Im Falle der Messung an Filmen oder Scaffolds wird aufgrund der schlechten Löslichkeit und der gesteigerten Kristallinität hochdeacetylierter Chitosane im Vergleich zu den teils wasserlöslichen Chitosanen mit einem Acetylierungsgrad im Bereich von 50 % eine deutlich schlechtere Zugänglichkeit der hochdeacetylierten Chitosane für Lysozym hervorgerufen und resultiert in einer stark reduzierten Abbaugeschwindigkeit.